



**ESTUDIO DEL PAPEL INMUNOPATOGENICO DE LAS  
MOLÉCULAS TROMBOSPONDINA-1 Y GADD45-  
ALFA EN LA PSORIASIS.**

**Autor:** Pedro Rodríguez Jiménez.

**Directoras:** Dra. Hortensia de la Fuente Flores y Dra. Mar Llamas Velasco.

**Fecha:** Mayo de 2020.



**Agradecimientos:**

A los doctores Esteban Daudén, Hortensia de la Fuente, Mar Llamas y Pablo Chicharro por toda su ayuda a lo largo del camino de la elaboración de esta tesis doctoral.

A mi mujer, Elisa, por su apoyo incondicional.



# ÍNDICE

1. **Prólogo.**
2. **Resumen.**
3. **Introducción.**
  - 3.1. **Inmunopatogenia de la psoriasis.**
    - 3.1.1. Inmunidad innata.
    - 3.1.2. Inmunidad adaptativa.
    - 3.1.3. Moléculas inmunoreguladoras en psoriasis
    - 3.1.4. Trombospondina-1.
    - 3.1.5. GADD45-alfa.
4. **Justificación.**
5. **Objetivos generales del estudio.**
6. **Partel: Estudio del papel de trombospondina-1 en la respuesta inflamatoria de la psoriasis.**
  - 6.1. Objetivo.
  - 6.2. Material y métodos.
  - 6.3. Resultados.
7. **Parte II: Estudio de GADD45 alfa y su función de de-metilación en psoriasis.**
  - 7.1. Objetivo.
  - 7.2. Material y métodos.
  - 7.3. Resultados.
8. **Discusión**
9. **Conclusiones.**
10. **Bibliografía.**
11. **Anexos:**
  - 11.1. Consentimiento informado
  - 11.2. Publicaciones asociadas.
  - 11.3. Pies de figuras y tablas
  - 11.4. Acrónimos.
  - 11.5. Material suplementario.



# 1. Prólogo

A lo largo de los años se han identificado múltiples marcadores diagnósticos y terapéuticos para un mejor manejo clínico de la psoriasis. Sin embargo, a pesar de los grandes avances en el conocimiento de la patogénesis de la psoriasis, precisar qué tratamiento puede ser el más efectivo para un determinado paciente y finalmente predecir la respuesta a una determinada terapia en un paciente concreto son cuestiones aún por resolver.

El grupo de investigación liderado por los Dres. Esteban Daudén y Francisco Sánchez-Madrid ha trabajado en las últimas décadas con diferentes generaciones de inmunólogos y dermatólogos permitiendo desarrollar múltiples líneas de investigación relacionadas entre sí, que van ofreciendo resultados que a la postre se traducen en cambios en la práctica clínica.

Nuestros resultados en esta tesis doctoral, en el estudio de dos moléculas relacionadas hasta el momento de manera indirecta y con poca evidencia con la inmunopatogenia de la psoriasis, suministran nuevos datos y argumentos sobre su importancia y la necesidad de profundizar en la investigación de los mecanismos moleculares de TSP-1 y GADD45a, lo cual será crucial para identificar posibles objetivos terapéuticos, identificando en estos nuevos estudios, otras moléculas o vías que en el futuro podrán ser utilizadas bien como marcadores diagnósticos, pronósticos o incluso, dianas terapéuticas.

Las líneas de investigación de la presente tesis fueron presentadas en forma de comunicación oral en la reunión de la Sección centro de la Academia Española de Dermatología y Venereología en junio de 2018.

El trabajo directo de la tesis, antes de la defensa de la presente tesis doctoral, ha dado lugar a dos publicaciones doctorales. Una de ellas ya publicada en un artículo original:

- Rodríguez-Jiménez P, Chicharro P, Llamas-Velasco M, Cibrian D, Trigo-Torres L, Vara A, Jiménez-Fernández M, Sevilla-Montero J, Calzada MJ, Sánchez-Madrid F, de la Fuente H, Daudén E. Thrombospondin-1/CD47 Interaction Regulates Th17 and Treg Differentiation in Psoriasis. *Front Immunol*. 2019 Jun 4;10:1268. doi: 10.3389/fimmu.2019.01268. PMID: 31214201; PMCID: PMC6558197.
- Revista: *Frontiers Immunology*. Factor de impacto en 2018 (6.429).

Y un segundo trabajo original se encuentra en revisión:

- Rodríguez-Jiménez P, Fernández-Messina L, Ovejero C, Chicharro P, Vara A, Martínez-Fleta P, Jiménez-Fernández M, Sánchez-García I, Llamas-Velasco M, Sánchez-Madrid F, Abad F, Dauden E, de la Fuente H. Expression and interactions of Growth Arrest and DNA Damage-inducible proteins (GADD45) in Psoriasis. *Br J Dermatol* [En revisión].
- Revista: *British Journal of Dermatology*. Factor de impacto en 2018 (6.714).



Así mismo, en paralelo, han dado lugar a participar en líneas de investigación relacionadas que han dado lugar a las publicaciones:

1. Martínez-Hernández R, Fuente H, Lamana A, Sampedro-Núñez M, Ramos-Levi A, Serrano-Somavilla A, García-Vicuña R, Ortiz AM, Daudén E, Llamas-Velasco M, Chicharro P, Rodríguez-Jiménez P, Sanz-García A, Sánchez-Madrid F, González-Álvaro I, Marazuela M. Utility of circulating serum miRNA profiles to evaluate the potential risk and severity of immune-mediated inflammatory disorders. *J Autoimmun.* 2020 Jul;111:102472. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102472. Epub 2020 May 5. PMID: 32381457.
2. Chicharro P, Rodríguez-Jiménez P, Llamas-Velasco M, Montes N, Sanz A, Cibrian D, Vara A, Gómez M, Jiménez-Fernández M, Martínez-Fleta P, Sánchez-García I, Lozano-Prieto M, Triviño J, Miñambres R, Sánchez-Madrid F, Dauden E. Expression of miR-135b in psoriatic skin and its association with disease improvement. *Cells* [En revisión].
3. Chicharro P, Rodríguez-Jiménez P, De la Fuente H, Fraga-Fernández J, Cibrian D, Sánchez-Madrid F, Daudén E. Mixed profile of cytokines in paradoxical eczematous eruptions associated with anti-IL-17 therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [En revisión].

## 2. Resumen

### Introducción:

Trombospondina-1 (TSP1) es una molécula con funciones antiangiogénicas e inmunomoduladoras. La proteína inductora del crecimiento y del daño al ADN alfa (GADD45a) ejerce su función por medio de interacciones proteína-proteína en el núcleo y el citoplasma y está implicada en la reparación del ADN, la proliferación celular, la supervivencia celular y la diferenciación entre otros procesos biológicos. Su estudio en psoriasis no ha tenido conclusiones relevantes hasta el momento actual.

### Objetivo:

En este trabajo, estudiamos el papel del eje de señalización de TSP-1 y de GADD45a en el desarrollo y mantenimiento de las lesiones psoriásicas.

### Material y métodos:

Se analizó la expresión de RNAm de TSP-1 y su receptor CD47, así como de GADD45a y sus proteínas dianas en muestras de piel de pacientes con psoriasis y sujetos de control usando PCR en tiempo real e inmunofluorescencia. La expresión de estas moléculas también se evaluó en células T CD4+ de sangre periférica y en células dendríticas derivadas de monocitos. Por último, se analizó el perfil de metilación del UCHL1 mediante *microarray*.

### Resultados:

La piel lesional de los pacientes con psoriasis presenta una menor expresión de RNAm de TSP-1 y CD47 comparados con la piel no lesionada o la piel de los controles. La tinción por inmunofluorescencia reveló una disminución en la expresión de CD47

en las células dérmicas CD45+ de las muestras de psoriasis en comparación con los controles. Las células T CD4+ periféricas y las células dendríticas primarias circulantes de la psoriasis también expresaron niveles más bajos de CD47 en comparación con los controles. Aunque no se detectaron diferencias significativas en la expresión de la TSP-1 en las células T CD4+ y las células dendríticas mieloides entre los pacientes y los controles, la expresión de la TSP-1 en los pacientes con psoriasis se correlacionó inversamente con la actividad de la enfermedad evaluada por mediante el índice PASI. Además, la TSP-1 inhibe la diferenciación de Th17 y estimula la diferenciación de las células T CD4+ hacia células Treg.

Se analizó la expresión de GADD45A en muestras de piel de pacientes de psoriasis tanto en piel lesional como no lesional, así como en biopsias de piel de sujetos de control. Nuestros datos mostraron que la piel de las lesiones y las células T de los pacientes psoriásicos expresan niveles más bajos de GADD45A en comparación con la piel no lesional o la piel de controles. Hubo una clara correlación positiva entre el GADD45a y el IFN-gamma usado como marcador de la inflamación innata. GADD45a no influye en las vías de activación de la p38.

La baja expresión de GADD45A resulta en una hipermetilación de los promotores de varios genes como el UCHL1 resultando en una disminución de su expresión en la piel de pacientes con psoriasis.

### **Conclusión:**

Debido al impacto del eje de señalización de la TSP-1/CD47 en la diferenciación del Th17 y el Treg, una expresión desregulada de estas moléculas en las células inmunes de los pacientes de psoriasis puede favorecer la respuesta inflamatoria exacerbada de esta enfermedad. La proteína GADD45a ha sido implicada en numerosos procesos biológicos y su expresión en la piel psoriásica es compleja y heterogénea entre los diferentes tipos celulares. Su participación en la regulación de la transcripción génica

mediante demetilación podría explicar en parte su efecto pleiotrópico, en el caso de la psoriasis regulando genes como UCHL1.



### 3.Introducción.

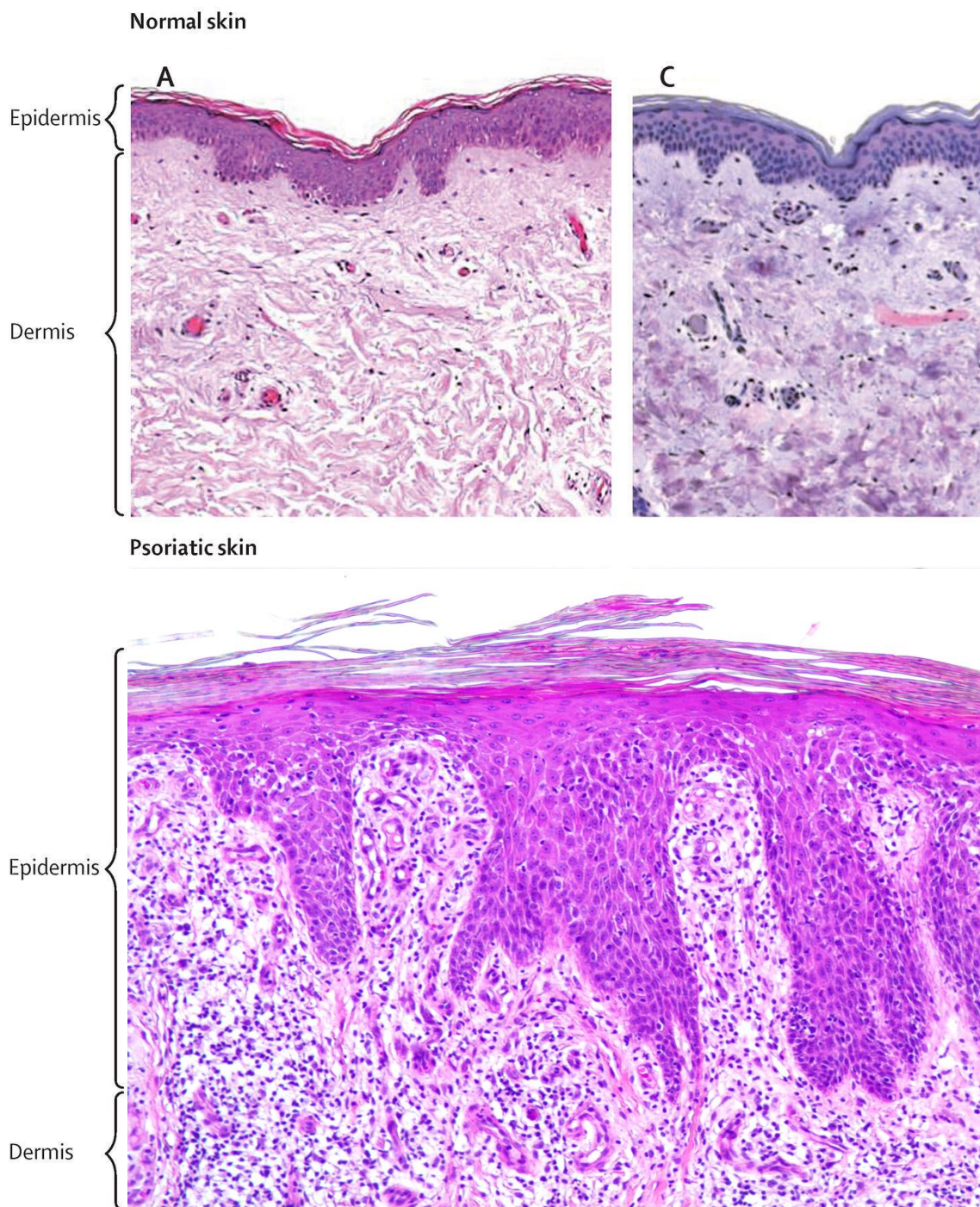
#### 3.1. Inmunopatogenia de la psoriasis.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria compleja mediada por el sistema inmunológico que se produce en personas genéticamente susceptibles y se presenta con el desarrollo de placas inflamatorias en la piel. En la histología se observa una hiperplasia regular, también llamada hiperplasia psoriasiforme de la epidermis, así como plexos vasculares dilatados en las papilas (Figuras 1-3).



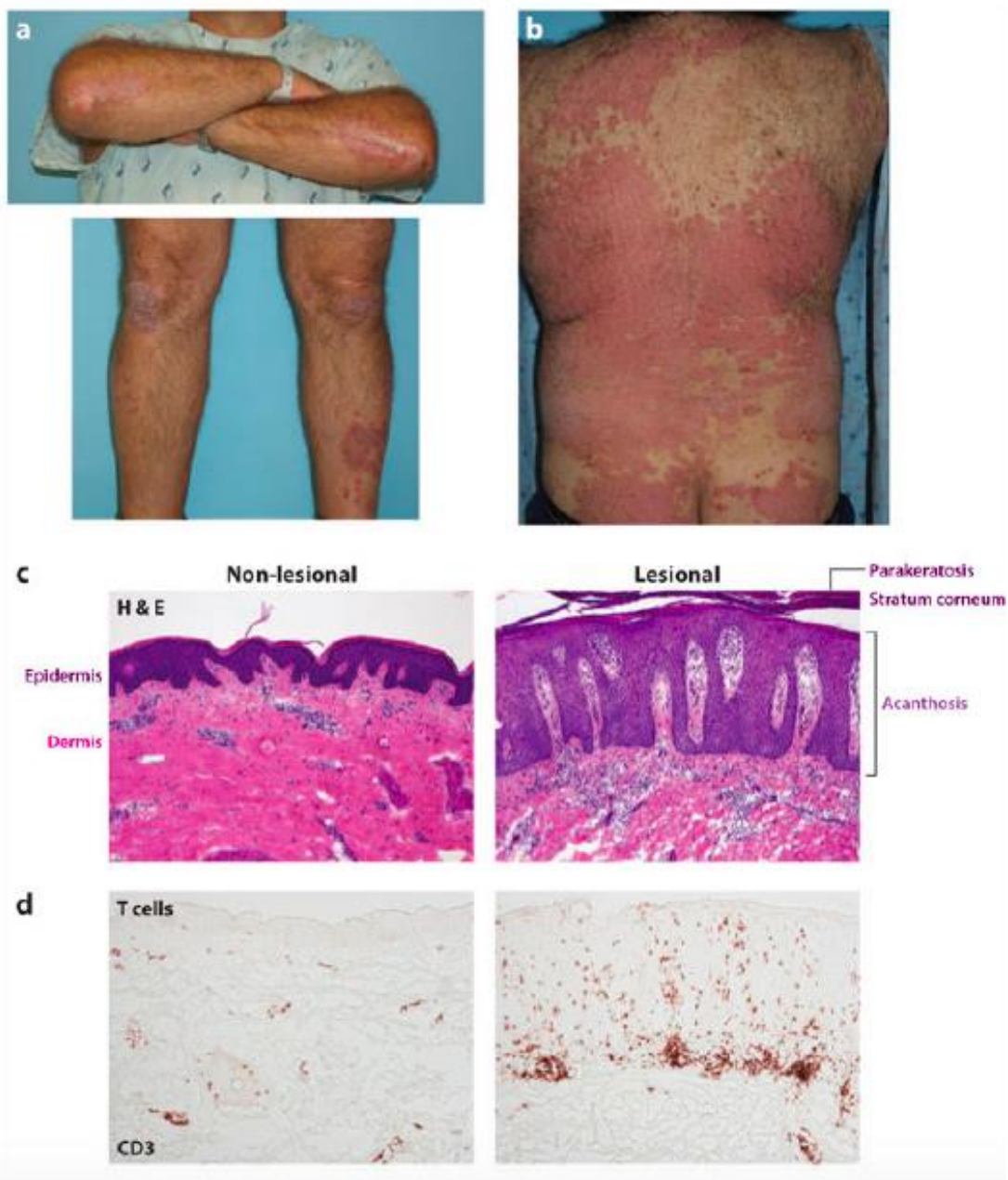
**Figura 1: Presentación clínica de la psoriasis en placas.** Paciente con placas eritemato-escamosas bien definidas, parcialmente confluyentes, con descamación

*nacarada, afectando principalmente región dorsolumbar pero también la cara posterior de brazos y antebrazos*



**Figura 2: Histopatología de la psoriasis.** Se visualiza hiperproliferación de queratinocitos epidérmicos (acantosis) junto con dilatación de capilares en papilas dérmicas e infiltrado de polimorfonucleares en la epidermis. Foto colección privada Prof. Llamas Velasco.





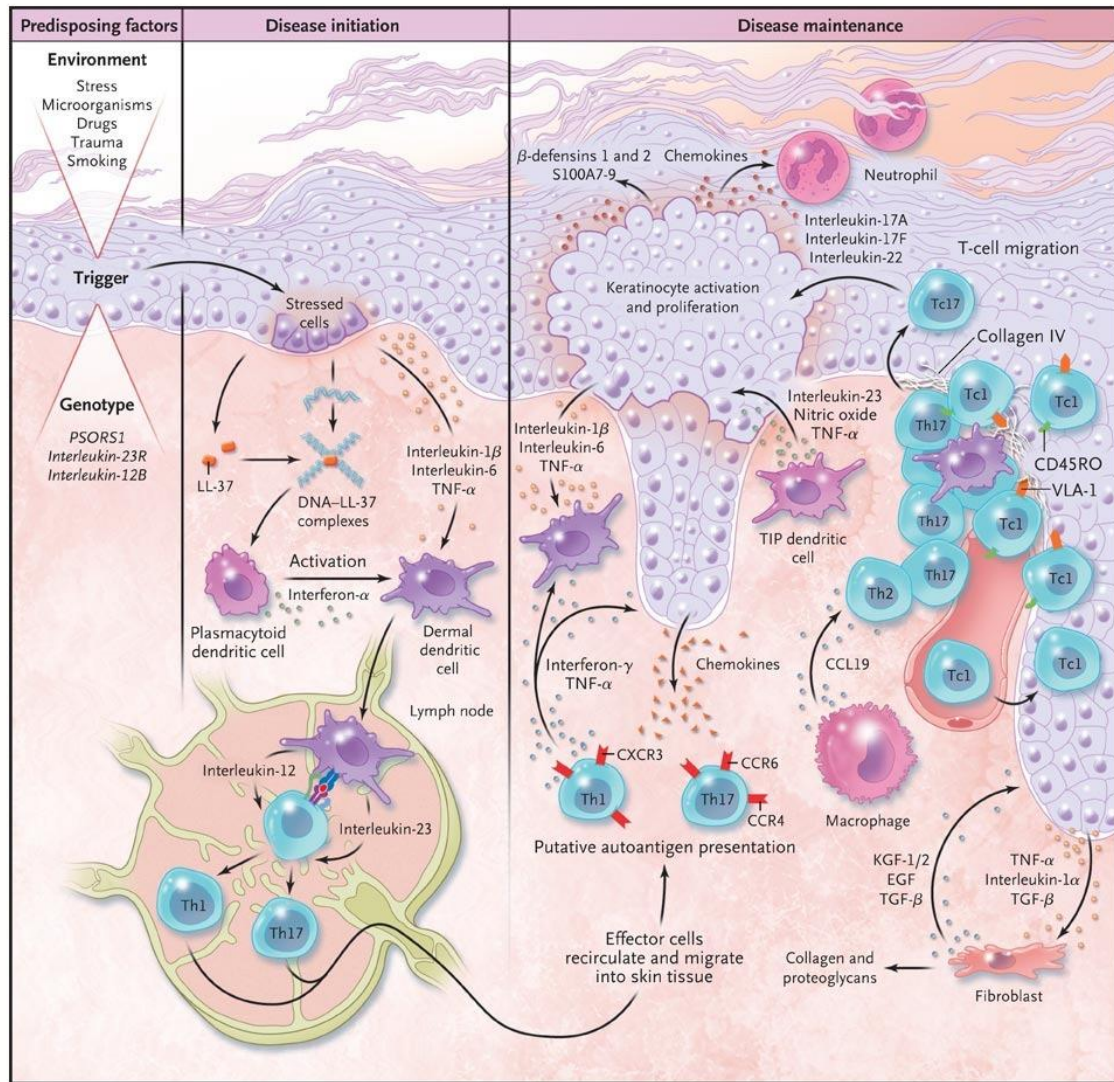
**Figura 3: Características clínicas e histológicas de la psoriasis.** a) Aparición clínica de la psoriasis vulgar crónica, que muestra placas escamosas eritematosas bien definidas de psoriasis en los codos y las rodillas. b) Espalda que muestra lesiones de psoriasis más extensas. c) Histología de la biopsia de piel no lesional y lesional a la misma escala, con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) donde los núcleos celulares se tiñen de azul. La epidermis se ve como una capa azulada debido a los núcleos de queratinocitos y forma un borde ondulado con la dermis, en tonalidad más rosada, debajo. En la dermis se ven los núcleos de las células estructurales e inmunes



*residentes. La piel de la psoriasis lesional muestra una epidermis muy engrosada (acantosis) con alargamientos en la dermis (crestas rete). La retención de núcleos (paraqueratosis) puede verse en estrato córneo engrosado y más compacto. Hay un incremento dramático en el número de células en la dermis, compuestas predominantemente de células dendríticas (DCs) y células T. d) Se observa un aumento del número de células T CD3+ en la piel de la psoriasis lesional, que a menudo forman grupos de tipo linfoide con DCs. Todas las imágenes aumento x10. Imagen tomada de [Lowes et al., 2015]*

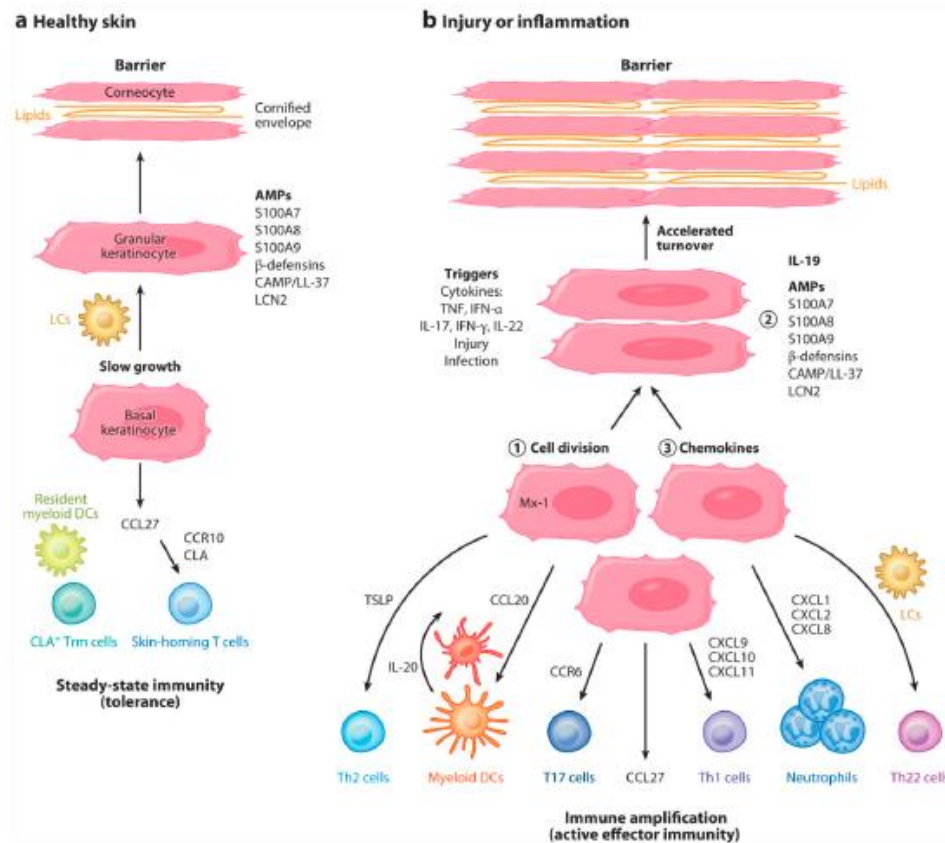
Aunque los primeros conceptos sobre la patogénesis de la psoriasis se centraron principalmente en la hiperproliferación de queratinocitos, actualmente se reconoce que la desregulación del sistema inmunológico es un acontecimiento crítico de la enfermedad. La evolución de los conocimientos sobre el papel del sistema inmunitario en la psoriasis ha tenido un impacto significativo en el desarrollo de tratamientos y marcadores de respuesta y muchos de los agentes terapéuticos nuevos o en fase de estudio tienen como dianas a moléculas específicas de la respuesta inflamatoria presente en esta entidad.

La implicación del sistema inmunológico en la psoriasis se planteó por primera vez a partir de estudios que identificaron infiltrados complejos de leucocitos en la piel psoriásica [Bos et al. 1983, Braun-Falco et al. 1970]. Estudios posteriores han apoyado el concepto de que las interacciones entre las células de la inmunidad innata y los queratinocitos participan en el inicio y la perpetuación de la inflamación cutánea característica de la psoriasis [Nestlé et al. 2009]. La secuencia básica de los acontecimientos inmunológicos que propone el modelo actual durante el desarrollo de la psoriasis se muestra en las Figura 4 y 5 [Nestlé et al. 2009]:



**Figura 4: Modelo inmunopatogénico actual de la psoriasis.** Estímulos antigénicos contribuyen a la activación de las células dendríticas plasmocitoides y otras células inmunes innatas de la piel. Citoquinas proinflamatorias producidas por las células inmunes innatas, incluido el IFN-alfa, estimulan la activación y la migración de diversas células dendríticas mieloides de la piel. Células dendríticas mieloides producen a su vez citoquinas, en particular la interleuquina IL-23, que estimulan la quimiotaxis o el reclutamiento, diferenciación y activación de las células T. Las células T reclutadas producen citoquinas, en particular la IL-17A, que presenta sinergia con otras citoquinas para estimular la proliferación de queratinocitos y producir péptidos y citoquinas antimicrobianas proinflamatorias. Citoquinas producidas por los leucocitos y los queratinocitos perpetúan el proceso inflamatorio mediante la

participación en bucles de retroalimentación positiva. Figura tomada de [Nestlé et al. 2009].



**Figura 5: Diferencias en expresión inmune en piel sana y piel lesionada en pacientes con psoriasis. a) Piel sana y b) piel lesionada psoriásica. Imagen tomada de [Lowes et al., 2015]**

### 3.1.1 Inmunidad innata.

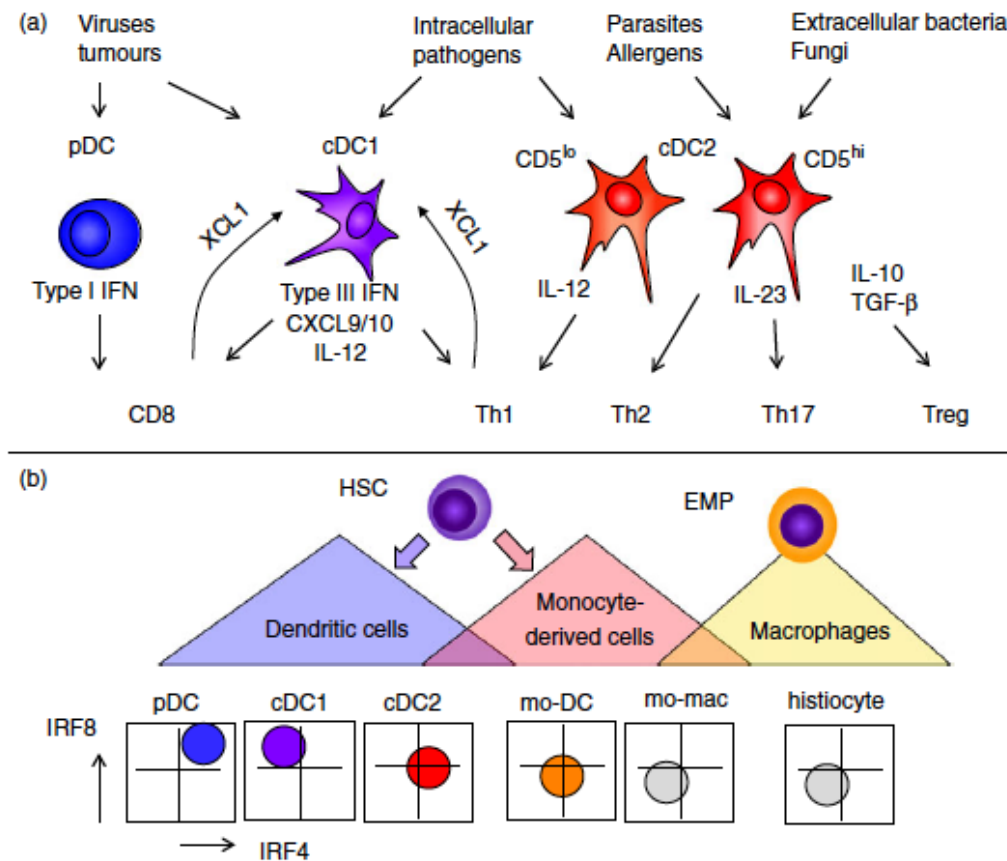
Los componentes celulares del sistema inmunológico innato que se han vinculado a la fisiopatología de la psoriasis incluyen las células profesionales presentadoras de antígenos (CPA), las células dendríticas (DCs, del inglés *dendritic cells*) y los macrófagos, así como los neutrófilos. Las citoquinas producidas por estas células que parecen desempeñar el papel más importante en el desarrollo de la psoriasis

incluyen el interferón (IFN)-alfa, el factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, y la interleuquina (IL)-23.

### **Células Dendríticas (DCs)**

Las DCs son una clase de células derivadas de la médula ósea que surgen de las células hematopoyéticas pluripotenciales formando una interfaz esencial entre la detección innata de patógenos y la activación de la inmunidad adaptativa. Los principales tipos de DCs (descritos en la psoriasis son las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) y las células dendríticas mieloides o convencionales (mDCs), ambos tipos celulares producen una serie de citoquinas inflamatorias que influyen en la actividad de las células T tales como como el IFN-alfa o TNF-alfa.

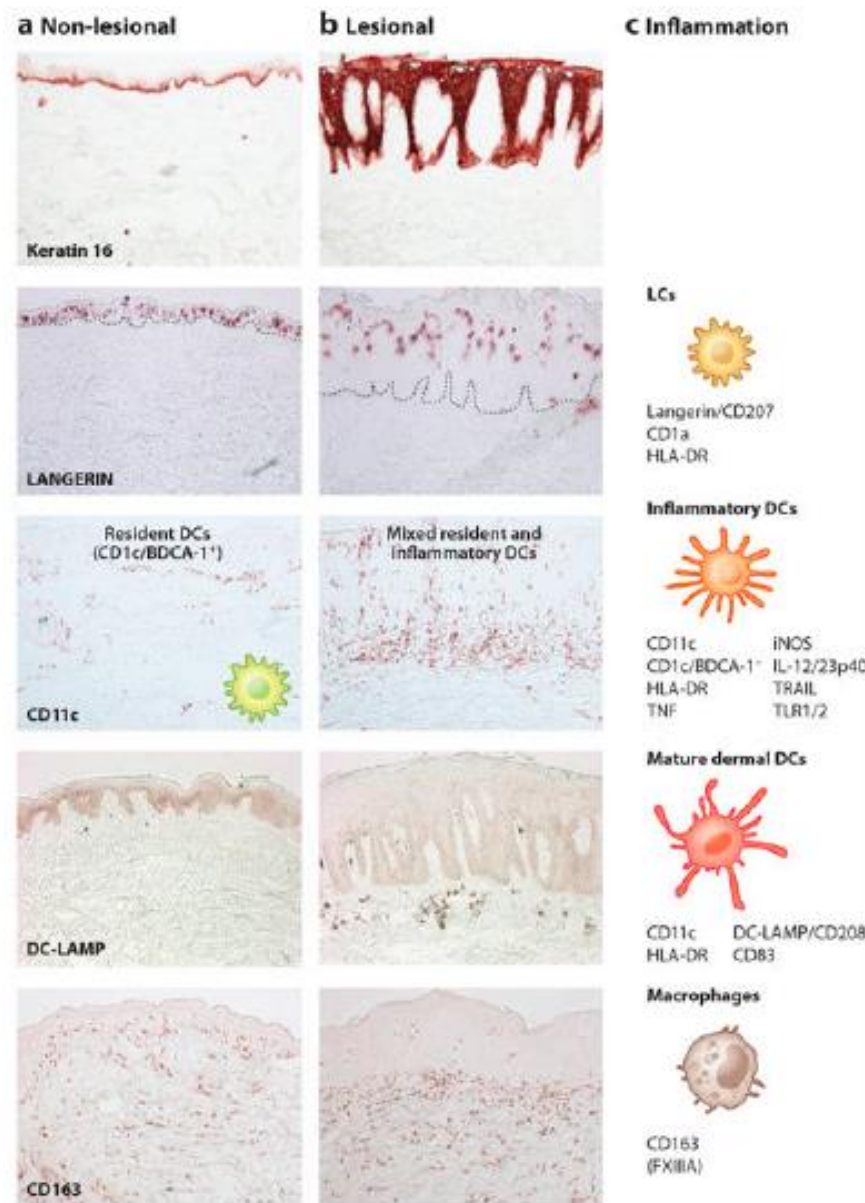
La clasificación funcional y anatómica separa las DCs como "DCs migratorios" y "DCs residentes" y esta clasificación sigue siendo útil para definir el contexto anatómico. Sin embargo, los estudios de expresión genética han impulsado una clasificación robusta de las DCs basado principalmente en el linaje, y que se correlaciona con la expresión diferencial de factores clave de transcripción como factores reguladores de interferón 8 y 4 (IRF8 e IRF4) [Guilliams et al., 2014]. Actualmente se reconocen dos tipos de mDCs, uno que corresponde a los dos subconjuntos de la DC mioide previamente definidos por la expresión de CD141 y CD1c y que se conocen como DCs convencionales (DCc) y las DC derivadas de monocitos (mo-DC) (Figuras 6y 7) [Ziegler-Heitbrock et al., 2010].



**Figura 6: Visión general ontológica y especialización funcional de las DCs.** a) Las DCs suelen representarse como una única célula "polivalente" en los diagramas de diferenciación de las células T, pero cada subconjunto se especializa para dar respuestas específicas a señales de patógenos o de peligro. Dependiendo del contexto, pueden observarse muchas respuestas diferentes, en este esquema se representan las funciones principales seleccionadas de la pDCs y las DC convencionales (aquí denominadas cDC1 cDC2. b) Base ontológica de la clasificación de las DCs, los monocitos y los macrófagos. Las células madre hematopoyéticas (HSC por sus siglas in inglés) dan lugar a la DC y a las células derivadas de monocitos por rutas distintas marcadas por diferencias en la expresión relativa del factor regulador del interferón 8 (IRF8) y el IRF4. Los monocitos tienen un IRF4/8 bajo, pero pueden ser inducidos a diferenciarse en DC derivadas de monocitos (mo-DC). Los macrófagos derivados de monocitos son ontológicamente distintos de muchas poblaciones de macrófagos residentes de larga vida derivados de los primeros progenitores



mieloides. EMP: Progenitores eritroides/mieloides, del inglés Erythroid/myeloid progenitors Tomada de [Collin et al., 2018].



**Figura 7: Componentes celulares inmunes de la piel psoriásica de apariencia normal e inflamada.** Se muestra la inmunohistoquímica representativa de a) la piel de apariencia normal y no lesional de los pacientes psoriásicos y b) la piel con psoriasis lesional, así como c) un diagrama de los componentes celulares inmunes y sus receptores de superficie durante la inflamación. La queratina 16 tiñe la epidermis basal en la piel no lesional, pero tiñe la epidermis de espesor total en la psoriasis. Las células Langerhans (LC) Langerin/CD207<sup>+</sup> se encuentran dispersas en la epidermis

*inferior en la piel no lesional y se encuentran más arriba en la epidermis más gruesa de las lesiones de psoriasis. Las LCs también se identifican por CD1a y HLA-DR. Las células dendríticas mieloides residentes (CD11c+ BDCA-1+) se encuentran en la dermis superior en la piel no lesional. Durante la inflamación psoriásica, el número de CD11c+ DC inflamatorias que son CD1c/BDCA-1- aumenta en la epidermis y la dermis. Estas células también expresan HLA-DR, TNF, iNOS, IL-12/23p40, TRAIL, y TLR1/2. Los CD residentes son estables en número entre la piel no lesional y la lesional y son tanto CD11c+ como BDCA-1+. No obstante, las DC mieloides residentes en la dermis se vuelven más maduras en la psoriasis, como lo demuestra la expresión de DC-LAMP/CD208. Los macrófagos CD163+ están dispersos por toda la dermis en la piel no lesional y aumentan aproximadamente el doble en la piel lesional. Estas células CD163+ también son FXIIIA+, aunque se prefiere el CD163 como marcador. Imagen tomada de [Lowes et al., 2015].*

Las pDCs están especializadas en detectar y responder a infecciones virales a través de varios mecanismos mediados por la rápida producción de grandes cantidades de interferones de tipo I y tipo III a través de la señalización de los receptores TLR (*toll like receptor* por sus siglas en inglés) 7 y 9. En condiciones homeostáticas, estas células están ausentes en la piel, pero su número aumenta considerablemente en las lesiones precoces de la psoriasis [Wollenberg et al. 2002]. Estas células son las principales productoras de IFN-alfa, una citoquina clave involucrada en la fase de iniciación de las respuestas autoinmunes y que se encuentra aumentada en las lesiones psoriásicas iniciales [van der Fits et al. 2004].

En condiciones normales, las pDCs detectan ácidos nucleicos derivados de patógenos, pero son tolerantes al propio ADN o ARN liberado a partir células necróticas. La ruptura de la tolerancia de las pDCs al ADN/ARN propio puede conducir a la autoinmunidad. Este proceso implica la formación de inmunocomplejos (ADN-anticuerpos anti-ADN) como ocurre en el lupus eritematoso sistémico, o la

generación de agregados del ADN/ARN propio con el péptido antimicrobiano LL-37 descrita en la psoriasis [Ganguly et al., 1994]. De esta forma, estos ácidos nucleicos se convierten en potentes agonistas para los receptores TLR7 y TLR9, induciendo la producción de IFN-I por las DCs. Este proceso beneficioso en la inducción de una respuesta inflamatoria temprana en nuestra defensa en condiciones normales, y que además promueve la reepitelización de la piel dañada, supone una condición patológica en la psoriasis, donde además otros defectos impiden que esa inducción de la inflamación se revierta.

Las mDCs, tanto las convencionales como las derivadas de monocitos se localizan en la dermis y su número se encuentra marcadamente elevado en la piel psoriásica. En particular, se ha detectado un subconjunto inflamatorio de células dendríticas mieloides (que incluye las células dendríticas que expresan TNF-alfa e iNOS (TIP-DCs), las células dendríticas 6-sulfo LacNAc (sIaDCs), y las células dendríticas epidérmicas reclutadas en respuesta a la liberación de IFN-alfa y otras citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en la placa psoriásica [Farkas et al. 2001, Lowes et al. 2005, Zaba et al. 2007, Zaba et al. 2009, Hänsel et al. 2011, Martini et al. 2011].

Las mDCs producen IL-23, citoquina que causa la diferenciación de las células CD4+ precursoras en células Th17, e IL-12, citoquina que estimula el desarrollo de las células Th1 y las células T efectoras CD8+ [Hänsel et al. 2011, Martini et al. 2011, McKenzie et al. 2006]. Por último, también afectan a los queratinocitos y a la vascularización de la piel mediante la producción de IL-20 (un modulador de la función de los queratinocitos) y de óxido nítrico (un agente vasodilatador) [Wang et al. 2006].

### **Macrófagos y neutrófilos**

La importancia de los macrófagos en la psoriasis en los seres humanos no es clara. Los macrófagos se acumulan en la piel psoriásica cerca de la membrana basal [Boehncke et al. 1995] y pueden contribuir a la psoriasis mediante la presentación



de antígenos a las células T, así como la producción de citoquinas. Además, el agotamiento de los macrófagos puede inducir cambios en la piel similares a la psoriasis en modelos de ratones [Wang et al. 2006].

Los neutrófilos son prominentes en las lesiones de la psoriasis, y se encuentran en colecciones a lo largo de la epidermis que se denominan microabscesos de Munro. La IL-8 es un factor quimiotáctico para los neutrófilos y se encuentra muy elevada en la piel psoriásica [Glowacka et al. 2010, van der Kerkhof et al. 1987]. Existe evidencia de su papel como productores de IL-17A, una importante citoquina con múltiples efectos en las placas psoriásicas [Reich et al. 2015].

### **Citoquinas de la inmunidad innata.**

Respecto a las citoquinas de la inmunidad innata más estudiadas, destacan el IFN-alfa, TNF-alfa, IL-23 e IL-12.

#### IFN-alfa

Las vías de interferón de tipo I están reguladas en las lesiones tempranas de la psoriasis [van der Fits et al. 2004]. El IFN-alfa presente en la piel psoriásica se deriva en gran parte de las pDCs [van der Fits et al. 2004]. Las pruebas que respaldan el papel clave del IFN-alfa en la psoriasis incluyen la observación de que el tratamiento sistémico con IFN-alfa puede exacerbar la psoriasis [Funk et al. 1991, Ketikoglou et al. 2005]. Además, el tratamiento tópico con Imiquimod, que induce la producción local de IFN-alfa en la piel, estimula el desarrollo de psoriasis en seres humanos y de enfermedades similares a la psoriasis en los ratones [van der Fits et al. 2009]. Por otro lado, los ratones deficientes en factor de transcripción que reprime las señales de interferón de tipo I desarrollan una enfermedad similar a la psoriasis [Hida et al. 2000]. La producción de IFN-alfa está mediada por la señalización de los TLR 7 y 9 estimulados por la presencia de ADN endógeno [Patel et al. 2011].

### TNF-alfa

El TNF-alfa es una citoquina proinflamatoria crítica y que es común a muchos estados de enfermedades inflamatorias, incluyendo la psoriasis [Tracet et al. 2008]. Las células dendríticas activadas, las células Th17 y Th1, y los queratinocitos de la piel psoriásica producen TNF-alfa y responden a sus efectos. El TNF-alfa también funciona sinérgicamente con otras citoquinas para promover la patogénesis de la enfermedad. Las siguientes observaciones en diferentes estudios respaldan el importante papel del TNF-alfa en la psoriasis:

- Niveles de TNF-alfa: Se encuentran en la piel lesional de los pacientes psoriásicos [Uyemura et al. 1993].
- Se observa una mejora clínica de la psoriasis con los inhibidores farmacológicos del TNF-alfa aprobados para esta indicación terapéutica (infliximab, adalimumab, etanercept, y certolizumab pegol) [Menter et al. 2008, Papp et al. 2005, Reich et al. 2005].
- El bloqueo de TNF-alfa circulante a través de la administración de etanercept (un inhibidor de TNF-alfa) resulta en una disminución del número de células dendríticas y células T junto con una reducción de la hiperplasia epidérmica en la piel psoriásica [Zaba et al 2007].

### IL-23.

La IL-23 es la citoquina responsable de la proliferación y supervivencia de las células Th17, que es un subconjunto de células T cada vez más importante en muchas enfermedades autoinmunes, incluyendo la psoriasis y que se caracterizan por la producción de IL-17 [Stockinger et al. 2007, Blauvelt et al. 2008, Tesmer et al. 2008]. La IL-23 es producida por las mDCS y, en niveles bajos, por los queratinocitos [Gerosa et al. 2008, Piskin et al. 2006]. La producción de esta citoquina por las células

dendríticas puede ocurrir a través de vías de señalización de receptores similares a los TLR [Higgins et al. 2006, Re et al. 2001].

La importancia de la IL-23 para la patogénesis de la psoriasis ha sido demostrada por lo siguiente:

- En psoriásicos, la IL-23 está elevada en las lesiones de la psoriasis en comparación con la piel no afectada y se localiza en las células dendríticas dérmicas y los queratinocitos; los niveles de IL-23 además disminuyen con el tratamiento eficaz de la psoriasis [Chan et al. 2006, Chamian et al. 2005, Lee et al. 2004, Piskin et al 2004, Toichi et al. 2006].
- La inyección de IL-23 en la piel normal de los ratones produce cambios que son clínica e histológicamente similares a los de la psoriasis; este proceso depende de la producción posterior de IL-22 e IL-17A [Chan et al. 2006, Rizzo et al. 20011]. Además, el bloqueo de la IL-23 en un modelo de ratón *knocked out* (KO) (deficiente en IL-23), impide el desarrollo de psoriasis [Zheng et al. 2007].
- Diferentes polimorfismos en los genes que codifican un componente del receptor de la IL-23, IL23R, y las subunidades p40 y p19 de la IL-23 se han vinculado a la psoriasis [Liu et al. 2008].
- Los anticuerpos monoclonales que se unen selectivamente a la subunidad p19 de la IL-23 (guselkumab, tildrakizumab, risankizumab y mirikizumab), bloqueando así los efectos mediados por la IL-23 en las células Th17 son muy eficaces en el tratamiento de la psoriasis [Papp et al. 2017, Blauvelt et al. 2017, Papp et al. 2015]. Además, el agente biológico ustekinumab, que inhibe tanto la señalización de la IL-23 como de la IL-12 al unirse a la subunidad p40

compartida de estas citoquinas, es eficaz para la psoriasis [Krueger et al. 2007].

- La molécula BMS-986165 inhibe la señalización mediada por el receptor de la IL-23 mediante el bloqueo selectivo de Tyk2, una tirosina quinasa que actúa en la vía de señalización del receptor de la IL-23. El tratamiento con este fármaco ha dado lugar a una mejora de la psoriasis en ensayos clínicos fase II y se encuentra actualmente en fase III [Papp et al. 2018].

### IL-12

La IL-12, al igual que la IL-23, es producida por células dendríticas mieloides activadas, y esta citoquina promueve la diferenciación de las células Th1 (principales productoras de INF-gamma). La evidencia indirecta del papel de la IL-12 en la psoriasis provenía de los hallazgos del aumento de células Th1 así como del del IFN-gamma (un producto de las células Th1) en la piel psoriásica [Lowes et al. 2008, Szabo et al. 1998]. No obstante, el grado en el que la IL-12 contribuye a la psoriasis se puso en duda por el fracaso de un estudio para detectar el impacto de la regulación de la subunidad p35 de la IL-12 en la piel psoriásica [Lee et al. 2004]. Además, algunos modelos preclínicos en ratones sugieren un papel regulador o protector de la IL-12 para contrarrestar la vía inmunológica de la IL-23/Th17 [Kulig et al. 2016]. En ese punto, se postuló que ustekinumab, un agente biológico eficaz para la psoriasis que inhibe tanto a la IL-12 como a la IL-23 uniéndose a la subunidad p40 compartida por ambas citoquinas [Tonel et al. 2010, Lowes et al. 2008], pudiera funcionar principalmente a través de los efectos del fármaco en la vía de la IL-23 y esto motivó el estudio de los inhibidores directos de IL-23 (guselkumab, tildrakizumab, risankizumab y mirikizumab) [Papp et al. 2017, Blauvelt et al. 2017, Papp et al. 2015].

## Queratinocitos

Si bien el queratinocito es una célula epitelial que no forma parte puramente del sistema inmunológico, el papel de los queratinocitos epidérmicos como desencadenantes de la iniciación de la psoriasis es objeto de gran debate debido a sus funciones inmunes. Los péptidos antimicrobianos derivados de los queratinocitos, incluidos la beta-defensina, las catelicidinas y la psoriasina (S100A7), pueden ser inducidos por un traumatismo, y están aumentados en la epidermis psoriásica en las primeras etapas del desarrollo de la lesión [Hollox et al. 2008]. Estos péptidos antimicrobianos tienen efectos quimiotácticos e inmunomoduladores sobre las células dendríticas y las células T, y pueden contribuir a la inflamación cutánea. De forma similar, la proteína 5 derivada de los melanocitos, similar a la de los ADAMTS, también puede funcionar como un desencadenante antigénico de la vía de la IL-17 en los psoriásicos [Arakawa et al. 2005]. Una teoría sobre la iniciación de la psoriasis implica el aumento de la catelicidina LL-37 en la piel. La LL-37 puede unirse al ADN propio y estimular la producción de IFN-alfa por parte de las células dendríticas plasmocitoides a través del TLR-9 [Lande et al 2007] (Figura 3). LL-37 también ha demostrado ser antigénico en la psoriasis; LL-37 estimula tanto las células T CD4+ como las CD8+ de una manera restringida al antígeno leucocitario humano (HLA) [Lande et al. 2014].

La hiperplasia de queratinocitos característica de la psoriasis puede desarrollarse debido a los efectos de las citoquinas producidas por las células inmunes. La IL-22 es producida por las células Th17 y promueve muchos de los cambios epidérmicos que se producen en las lesiones psoriásicas. Además, la producción de IL-20 por parte de los queratinocitos desempeña un importante papel sinérgico en la evolución de la IL-22. Tanto la IL-22 como la IL-20 tienen una alta expresión en la piel psoriásica, y promueven alteraciones del grosor epidérmico, defectos de maduración, y una mayor regulación de los péptidos antimicrobianos [Blumberg et al. 2001, Wolk et al. 2009]. El papel de la IL-20 en la psoriasis está respaldado por la

observación de que el bloqueo de la IL-20 en un modelo de xenotrasplante de inmunodeficiencia combinada severa de psoriasis induce la resolución de la enfermedad y bloquea la iniciación de la enfermedad [Stendrup et al. 2009]. Las citoquinas y quimioquinas producidas por los queratinocitos activados contribuyen a perpetuar la respuesta inflamatoria en la psoriasis a través de sus efectos sobre las células de la inmunidad innata y adaptativa. Los análogos de la vitamina D tópica, así como los retinoides tópicos y orales, afectan principalmente a esta vía en la psoriasis. En un principio se pensó que el metotrexato también modulaba el componente epidérmico de la psoriasis, aunque las ideas actuales sugieren que sus efectos directos sobre el sistema inmunológico son más importantes.

### **3.1.2 Inmunidad adaptativa**

La importancia de las células T y sus citoquinas efectoras en la psoriasis se propugnó inicialmente tras el éxito de los medicamentos que inhiben las respuestas globales de las células T, como la ciclosporina [Ellis et al. 1986]. Otras terapias que bloquean la activación de los linfocitos T o inducen la muerte de los linfocitos T, como el alefacept (un inhibidor de la interacción de activación de los linfocitos T entre el LFA3 en las CPA y el CD2 en los linfocitos T que ya no está disponible en el mercado), demostraron su eficacia para el tratamiento de la psoriasis [Krueger et al. 2002]. Además, la inyección de linfocitos de pacientes psoriásicos puede inducir lesiones psoriasiformes en piel humana no lesional trasplantada a ratones con inmunodeficiencia combinada grave [Wrone-Smith et al. 1996]. La inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias mediante el bloqueo de la fosfodiesterasa 4 o la inhibición de la Janus quinasa/tirosina quinasa 2 en los linfocitos también ha demostrado mejorar la psoriasis [Papp et al. 2013, Papp et al, 2016].

## **Linfocitos T CD4+**

Las células T de ayuda CD4+ se encuentran a lo largo de los infiltrados inflamatorios dérmicos en la piel psoriásica [Nikaein et al. 1991]. El subconjunto Th17 de células T CD4+, y en menor medida las células Th1 y Th22, ha sido implicado en la psoriasis. Los primeros estudios de investigación preveían un papel dominante de las células Th1; sin embargo, el conocimiento actual indica que las células Th17 juegan el papel más crítico. El descubrimiento de las células Th17 ha llevado a importantes hallazgos sobre la fisiopatología de la psoriasis y a nuevos enfoques de tratamiento específicos. Las células Th17 se desarrollan en la piel psoriásica bajo los efectos de la IL-1, la IL-6, el TGF-beta, y la IL-23 producida por las células dendríticas inflamatorias [Di Cesare et al. 2009]. La activación de las células Th17 por el IL-23 estimula a estas células para que produzcan IL-17A e IL-22, citoquinas que promueven la activación y el crecimiento de los queratinocitos [Chiricozzi et al. 2011, Harper et al. 2009].

Los siguientes resultados de estudios destacan el papel de estas células en la psoriasis:

- Las células Th17 producen una serie de citoquinas proinflamatorias, entre ellas la IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-6, y TNF-alfa [Tesmer et al. 2008], todas las cuales han sido vinculadas a la psoriasis.
- Las células Th17 se encuentran en la piel de las lesiones y a niveles elevados en la circulación de los pacientes de psoriasis [Teunissen et al. 1998, Kagami et al. 2010].
- Los ratones transgénicos que sobreexpresan la subunidad p19 de la IL-23, un factor clave para el funcionamiento de las células Th17, tienen una grave enfermedad inflamatoria generalizada que incluye la inflamación de la piel [Wiekowski et al. 2001].

- Las terapias para la psoriasis, como la fototerapia, la ciclosporina, el etanercept y el infliximab, han demostrado modular la vía del Th17 en la psoriasis [Kagami et al. 2010, Haider et al. 2008, Rácz et al. 2011, Zaba et al. 2009].
- El bloqueo de la IL-17A (la principal citoquina efectora producida por las células Th17) por secukinumab e ixekizumab, así como el bloqueo dual tanto de la IL-17<sup>a</sup> como de la IL-17F por bimekizumab, conduce a una mejora espectacular de la psoriasis [Langley et al. 2014, Gordon et al. 2016, Papp et al. 2018]. Un éxito similar en la limpieza de la piel psoriásica se observa con el bloqueo de la IL-17RA, una subunidad del receptor de la IL-17A, por el brodalumab, que bloquea indirectamente la acción de distintos miembros de la familia IL-17 al actuar a nivel de receptor. [Lebwohl et al. 2015].

Las células Th1 producen un conjunto de citoquinas proinflamatorias, incluyendo IFN-gamma, IL-2, y TNF-alfa [Murphy et al. 2002]. El IFN-gamma, la citoquina prototípica producida por estas células, puede promover cambios similares a la psoriasis en la piel psoriásica no lesional [Wei et al. 1999]. Cabe destacar que infliximab, fármaco anti-TNF eficaz para la psoriasis, también es capaz de inhibir la producción de IFN-gamma por parte de las células Th1 [Haider et al. 2008]. La IL-12, una citoquina producida por las células dendríticas mieloides activadas, promueve la diferenciación de las células Th1. El grado en que los efectos mediadores de la IL-12 contribuyen a la psoriasis es incierto [Lee et al. 2004].

### **Linfocitos T CD8+**

Las células T CD8+ citotóxicas se encuentran principalmente en la epidermis de la piel psoriásica, y en general se considera que desempeñan un papel menos destacado en la psoriasis que las células T CD4+ [Lowes et al. 2007]. Aunque



producen enzimas citotóxicas, se especula que su papel en la psoriasis implica la elaboración de citoquinas inflamatorias, entre ellas la IL-17A [Conrad et al. 2007, Ortega et al. 2009, Gaspari et al. 2006, Liang et al 2015]. Curiosamente, la restricción clonal de las células T epidérmicas de memoria residente parece estar limitada al compartimento CD8+ [Cheuk et al. 2014]. Este hallazgo podría sugerir un vínculo entre los antígenos virales o autoantígenos de la epidermis y el desencadenamiento de la psoriasis, ya que estos tipos de antígenos restringidos por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I se presentan típicamente en las células T CD8+, y no en las células T CD4+ [Lin et al. 2001, Prinz et al. 1999]. Además, las células T de memoria residentes que son células T CD69+, CD103+, células T epidérmicas productoras de IL-17A se han vinculado a la recurrencia de la psoriasis en la piel previamente curada [Gallais Sérézal et al. 2018].

Los ratones CD8+, pero que son deficientes en células T reguladoras desarrollan piel con lesiones psoriasiformes [Wang et al. 2008]. También se ha descubierto que las células T reguladoras limitan la inflamación psoriasiforme en la piel de los ratones inducida por imiquimod mediante la modulación del IFN-alfa [Stockenhuber et al. 2018]. Además, se han encontrado defectos en la función supresora de las células T reguladoras en las lesiones de la psoriasis [Sugiyama et al. 2005, de la Fuente et al., 2012].

### **Citoquinas de la inmunidad adaptativa.**

#### IL17

La IL-17A, una citoquina efectora producida por las células Th17, está elevada en las lesiones de la psoriasis y en el suero de los pacientes con psoriasis [Wilson et al. 2007]. La IL-17A tiene muchas funciones que son potencialmente relevantes en la patogenia de la psoriasis, entre ellas la activación, el reclutamiento y la inhibición de la apoptosis en los neutrófilos; el aumento de la angiogénesis; la promoción de la

liberación de otras citoquinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-1 e IL-6); y la activación directa de los queratinocitos, que conduce a una mayor producción de quimioquinas [Albanesi et al. 2000, Dragon et al. 2008, Homey et al. 2000, Laan et al. 1999, Numaski et al. 2003, Ruddy et al. 2004, Starnes et al. 2002].

## IL22

Los niveles de IL-22 aumentan en la sangre de los pacientes con psoriasis y en las placas psoriásicas. El tratamiento de la psoriasis disminuye estos niveles [Wolk et al. 2006]. La IL-22 es producida por las células Th17 y las células Th22. Esta citoquina estimula el crecimiento y la activación de los queratinocitos y tiene poco efecto sobre las células inmunes. En los queratinocitos, la señalización mediada por la IL-22 a través de STAT3 estimula la hiperproliferación celular, la secreción de péptidos antimicrobianos y la producción de metaloproteinasas de matriz que apoyan el aumento de la movilidad celular [Boniface et al. 2005, Liang et al. 2006, Wolk et al. 2004]. Las terapias moleculares dirigidas contra a la IL-22 se encuentran actualmente en ensayos clínico [Nogales et al. 2011].

## TGF-beta

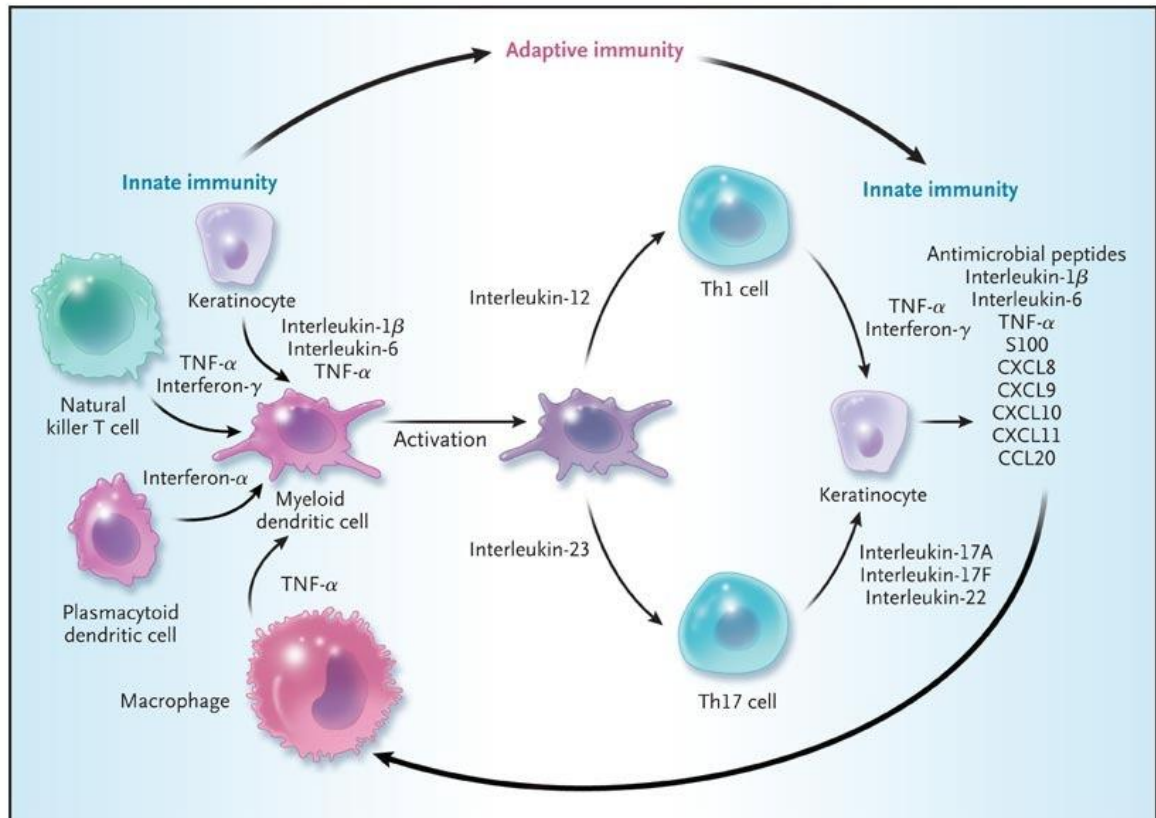
El factor de crecimiento y transformación beta (por sus siglas en inglés TGF- $\beta$ , abreviatura de *transforming growth factor* beta) pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que incluye tres isoformas para el TGF- $\beta$  (1,2,3). Son un tipo de proteínas involucradas en procesos de hematopoyesis, proliferación celular, angiogénesis, diferenciación, migración y apoptosis celular, por lo que es fundamental durante la embriogénesis y el desarrollo. La molécula con una función más amplia y la más estudiada en psoriasis es el TGF- $\beta$ 1. Se trata de una proteína homodimérica, producida por una gran variedad de células, como plaquetas, células endoteliales, linfocitos y macrófagos. En la mayoría de las células epiteliales, el TGF- $\beta$  es un inhibidor del crecimiento, ya que promueve la expresión de inhibidores del ciclo celular de las familias Cip/Kip e INK4/ARF. El TGF- $\beta$  es además un agente fibrogénico importante, que estimula la quimiotaxis de fibroblastos y aumenta la

expresión de colágeno, fibronectina y proteoglicanos. El TGF- $\beta$  tiene en global una fuerte acción antiinflamatoria, pero puede aumentar algunas funciones inmunes. Así, en ratones knock-out para el TGF- $\beta$ 1 tienen defectos en linfocitos T reguladores, lo que genera una inflamación extensa con abundante proliferación de linfocitos T y diferenciación de CD4+ en linfocitos "helper" Th1 y Th2. Se cree que el TGF $\beta$ 1 es un inhibidor de la hiperproliferación de queratinocitos asociada a la psoriasis [Flisiak et al., 2002]

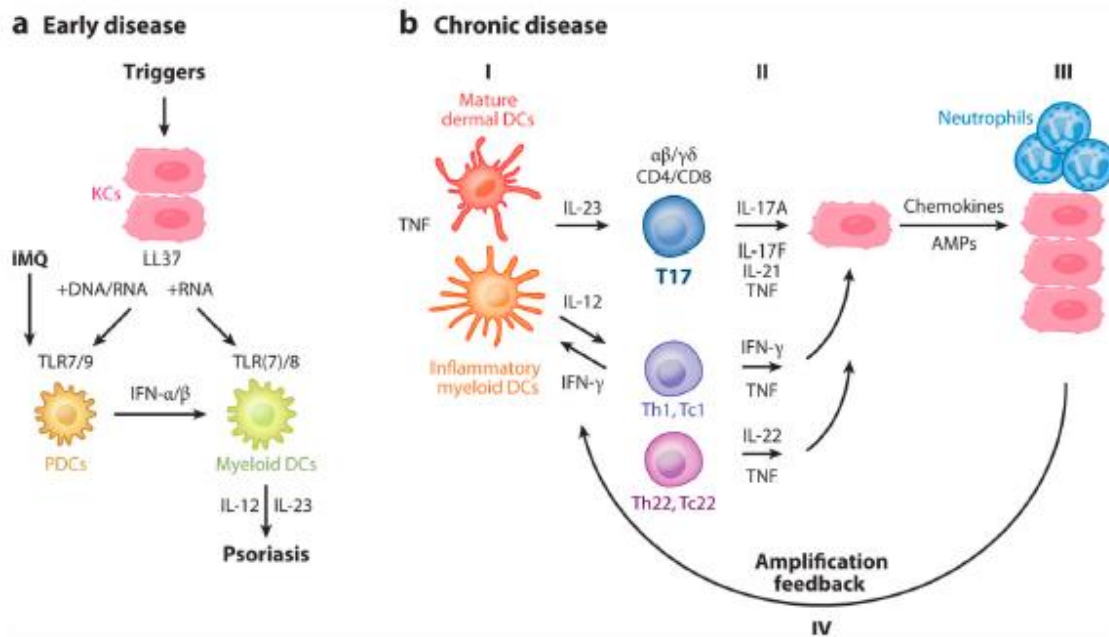
### **Angiogénesis**

En cuanto a la importancia de la vascularización, las células endoteliales dentro de las placas psoriásicas expresan niveles elevados del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), las prostaglandinas y el óxido nítrico, todo lo cual contribuye a los característicos vasos sanguíneos dilatados y tortuosos que abundan en la piel psoriásica en cortes histológicos [Costa et al. 2007, Detmar et al. 1994]. Se ha descubierto que los ratones transgénicos que sobreexpresan el VEGF en la epidermis desarrollan cambios psoriasiformes en la piel [Xia et al. 2003]. Además, la activación de endotelios promueve la atracción y la trasmigración de los leucocitos que se han mencionado anteriormente como importante componente de la inmunidad innata. Los agentes antiangiogénicos han demostrado cierto éxito en los pacientes de psoriasis [Ehrlich et al. 2004].

En las Figuras 8 y 9, se muestra un esquema la relación de los sistemas inmune innato y adaptativo.



**Figura 8: Células clave y mediadores en la transición de la inmunidad innata a la inmunidad adaptativa en la psoriasis.** Las células inmunes innatas producen citoquinas clave ([TNF- $\alpha$ , interferón- $\alpha$ , interferón- $\gamma$ , interleuquina-1 $\beta$ , e interleuquina-6) que activan las células dendríticas mieloides. Las células dendríticas activadas presentan antígenos y secretan mediadores como la interleuquina-12 y la interleuquina-23, lo que lleva a la diferenciación de las células T ayudantes tipo 17 y tipo 1 (Th17 y Th1). Las células T, a su vez, secretan mediadores (por ejemplo, interleuquina-17A, interleuquina-17F e interleuquina-22) que activan los queratinocitos e inducen la producción de péptidos antimicrobianos (por ejemplo, catelicidina LL-37 y  $\beta$ -defensinas), citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , interleuquina-1 $\beta$ , e interleuquina-6), quimioquinas (CXCL8 a través de CXCL11 y CCL20), y proteínas S100. Estos mediadores solubles se retroalimentan en el ciclo de la enfermedad proinflamatoria y dan forma al infiltrado inflamatorio. Figura tomada de [Nestlé et al. 2009].



**Figura 9: Vías de iniciación y mantenimiento de la psoriasis.** a) Enfermedad temprana: El imiquimod (IMQ), un agonista de TLR7, puede activar las células dendríticas plasmocitoides (pDC) para producir interferones (IFN). El LL37, un péptido derivado de la catelicidina, puede desempeñar un papel importante en la iniciación de las lesiones de la psoriasis por esta vía. El LL37 liberado de los queratinocitos (KCs) puede unirse a los ácidos nucleicos para activar las pDCs para liberar IFN-α/β. Los complejos LL37/ARN también pueden activar los DC mieloides residentes para producir IL-12 e IL-23, citoquinas psoriásicas clave. b) Enfermedad crónica: La principal vía patógena de la psoriasis se produce cuando (I) los DC dérmicos maduros y los DC mieloides inflamatorios producen citoquinas como la IL-23 y la IL-12. (II) Estas citoquinas activan las células T17 (Th17 y Tc17), Th1 y Th22 para contribuir al medio de las citoquinas y actuar sobre los queratinocitos. (III) Como se indica en la figura 1, los queratinocitos pueden producir quimioquinas y péptidos antimicrobianos (AMP) para (IV) aumentar las respuestas inmunológicas cutáneas. Imagen tomada de [Lowes et al., 2015]

En resumen, la psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que se caracteriza por la presencia de placas eritemato-escamosas bien delimitadas de la piel adyacente, aparentemente sana. Por tanto, los individuos con psoriasis tienen

áreas de piel afectada (piel lesional) así como áreas de piel no afectada, aparentemente sana (piel no-lesional). Las lesiones psoriásicas presentan un infiltrado importante de células del sistema inmune, principalmente linfocitos T y células dendríticas. Las citoquinas producidas por estas células, como el TNF-alfa, el IFN-gamma, la IL-17, la IL-22, la IL-23, la IL-12 y la IL-1b, inducen la activación de los queratinocitos y otras células residentes de la piel que a su vez secretan mediadores que influyen en la función de las células inflamatorias [Perera, Di Meglio et al. 2012]. Además de las mDCs residentes que se encuentran en condiciones normales en la piel, las lesiones psoriásicas contienen una población de mDCs inflamatorias. El tratamiento efectivo con diversos fármacos inmunodepresores, biológicos o con la radiación ultravioleta se ha correlacionado con una disminución en el número de las DCs inflamatorias, lo cual apoya el papel de estas células en la patogénesis de la enfermedad. Estas DCs producen moléculas proinflamatorias incluyendo TNF-alfa, iNOS, IL-23 e IL-20, e inducen la producción de IFN-gamma e IL-17 por las células Th1 y Th17 respectivamente. Por otro lado, los queratinocitos responden a los mediadores liberados por las DCs produciendo factores como la IL-8, CXCL1 y proteínas de la familia S100A que a su vez inducen la quimiotaxis de neutrófilos hacia la epidermis [Chamian and Krueger. 2004; Martin, Towne et al. 2013].

Un porcentaje elevado de pacientes con psoriasis tienen una enfermedad moderada a grave que requiere fototerapia o medicamentos sistémicos. Aunque los tratamientos disponibles en la actualidad han permitido alcanzar una gran eficacia en el tratamiento de la psoriasis, no son curativos y la toxicidad asociada a ellos hace que el desarrollo de terapias dirigidas contra dianas más específicas sea necesario [Lowes et al. 2007]. Recientemente, el desarrollo de agentes biológicos dirigidos contra componentes específicos del sistema inmune ha resultado en tratamientos muy efectivos en la psoriasis, como las terapias que neutralizan el TNF-alfa (adalimumab, etanercept e infliximab) y la subunidad p40 (ustekinumab) que comparten la IL-12 y la IL-23 [Laws and Young et al. 2012]. Por otro lado, como se ha mencionado previamente, la IL-17 estimula la secreción por parte de los

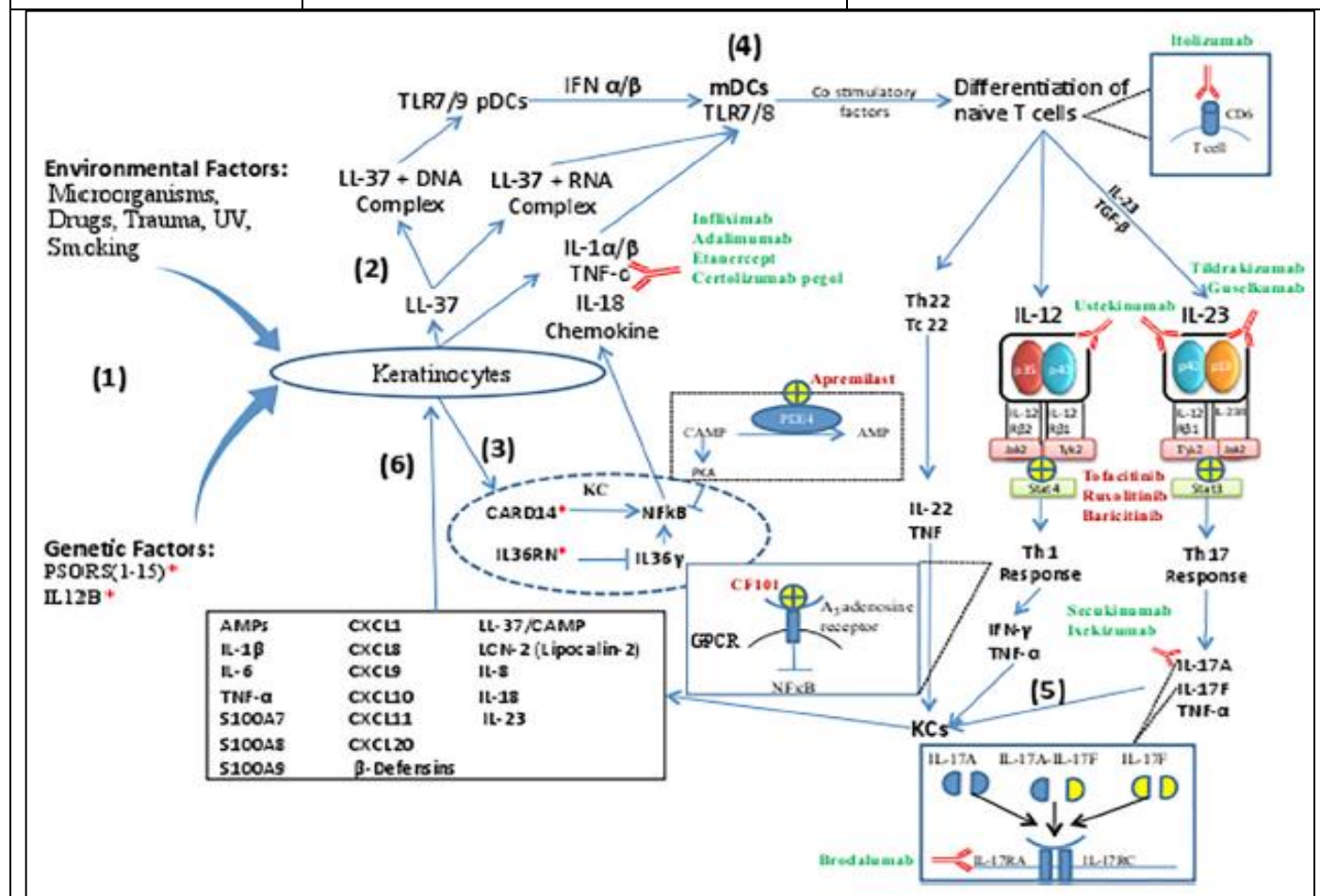
queratinocitos de múltiples citoquinas proinflamatorias y por ello otros fármacos biológicos de reciente aprobación utilizan esta interleuquina como su diana terapéutica con impresionante eficacia: secukinumab, un anticuerpo monoclonal recombinante, selectivo a la IL-17A e ixekizumab, un anticuerpo monoclonal con alta afinidad por las dos formas de la interleuquina (IL-17A e IL-17A/F) (Roman et al. 2015; Markham. 2016). De igual forma, recientemente se ha aprobado el empleo de un inhibidor de la fosfodiesterasa 4 (apremilast). Esta proteína es expresada por células que participan en la regulación de la respuesta inflamatoria [Deeks. 2015]. Por último, la nueva generación de fármacos biológicos ha conseguido demostrar mediante la inhibición de IL-23 una alta eficacia y seguridad en el tratamiento de la psoriasis (guselkumab, tildrakizumab, risankizumab y mirikizumab), [Papp et al. 2017, Blauvelt et al. 2017, Papp et al. 2015] dejándonos en el momento con un amplio arsenal terapéutico. La Tabla 1 resume los fármacos disponibles en el momento actual y su relación con la inmunopatogénesis de la psoriasis.

Tratamiento	Tipo de agente biológico	Indicación. Fecha autorización
Infliximab	Anticuerpo monoclonal IgG1 humano-murino quimérico anti-TNF alfa producido en células en hibridoma murino mediante tecnología de ADN recombinante.	Adultos con psoriasis en placas de moderada a grave que no han respondido o que tienen contraindicación a otra terapia sistémica. Agosto 1999.
Etanercept	Dímero de fusión del dominio extracelular soluble del receptor 2 de TNF tumoral humano y el dominio Fc de la IgG1 humana mediante técnicas de ADN recombinante a partir de un cultivo de células de OHC.	Adultos con psoriasis en placas de moderada a grave que no han respondido o que tienen contraindicación a otra terapia sistémica. Febrero 2000.
		Psoriasis en placas crónica grave en niños a partir de 6 años que no estén controlados o son intolerantes a otras terapias sistémicas. Febrero 2009.
Adalimumab	Anticuerpo monoclonal humano recombinante anti-TNF alfa producido en células de OHC.	Adultos con psoriasis en placas de moderada a grave que no han respondido o que tienen

		contraindicación a otra terapia sistémica. Septiembre 2003.
		Psoriasis en placas crónica grave en niños a partir de 4 años que no estén controlados o son intolerantes a otras terapias sistémicas. Abril 2015.
		Pacientes de al menos 12 años de edad con hidrosadenitis supurativa activa de moderada a grave que no responda adecuadamente a otros tratamientos convencionales sistémicos. Septiembre 2015.
Ustekinumab	Es un anticuerpo monoclonal anti p40 (subunidad e IL12/23) humano que se produce en una línea celular del mieloma de ratón utilizando tecnología de ADN recombinante.	Adultos con psoriasis en placas de moderada a grave que no han respondido o que tienen contraindicación a otra terapia sistémica. Enero 2009
Secukinumab	Anticuerpo monoclonal recombinante anti IL17 íntegramente humano, tipo IgG1/κ producido en células OHC.	Tratamiento de la psoriasis vulgar moderada a grave en adultos candidatos a tratamientos sistémicos. Marzo 2016
Ixekizumab	Anticuerpo monoclonal recombinante anti IL17 íntegramente humano, tipo IgG1/κ producido en células OHC.	Tratamiento de la psoriasis vulgar moderada a grave en adultos candidatos a tratamientos sistémicos. Marzo 2017
Brodalumab	Anticuerpo monoclonal recombinante humano que se produce en células OHC.	Tratamiento de la psoriasis vulgar moderada a grave en adultos candidatos a tratamientos sistémicos. Julio 2017
Guselkumab,	Anticuerpo monoclonal (Acm) de inmunoglobulina G1 lamda (IgG1λ) completamente humano anti proteína interleucina (IL)-23, producido en células OHC por tecnología del ADN recombinante.	Tratamiento de la psoriasis vulgar moderada a grave en adultos candidatos a tratamientos sistémicos. Noviembre 2017
Tildrakizumab,	Anticuerpo monoclonal (Acm) de inmunoglobulina G1 kappa (IgG1K) completamente humano anti proteína interleucina (IL)-23, producido en células OHC por tecnología del ADN recombinante.	Tratamiento de la psoriasis vulgar moderada a grave en adultos candidatos a tratamientos sistémicos. Septiembre 2018



Risankizumab	Anticuerpo monoclonal humanizado de tipo inmunoglobulina G1 (IgG1) selectivo, dirigido contra la proteína interleuquina (IL)-23, producido en células OHC por tecnología de ADN recombinante.	Tratamiento de la psoriasis vulgar moderada a grave en adultos candidatos a tratamientos sistémicos. Abril 2019
--------------	---	--



**Tabla 1: Fármacos biológicos aprobados para su uso en psoriasis y representación esquemática de su interacción con la fisiopatología de la psoriasis.** (1) Iniciación de la enfermedad (psoriasis). (2) Los queratinocitos entran prematuramente en la diferenciación terminal, causando la liberación de auto-ADN y ARN en el compartimiento extracelular. Los desencadenantes iniciales como un trauma físico o los productos bacterianos inician una cascada de eventos que incluyen la formación de complejos de ADN/ARN-LL-37, activación de las pDCs residentes y secreción de interferón-α/β (IFN-α/β). (3) Después de un desencadenante inflamatorio, una ganancia de función de polimorfismos de nucleótido único en CARD14 y una pérdida de función SNP en IL36RN, se pueden activar el NfκB que señalará la posterior

*activación de las células dendríticas mieloides maduras. (4) Las mDC activadas migran en los nódulos linfáticos de drenaje, donde el antígeno se presenta a las células T naïve. En presencia de factores co-estimulantes se induce la diferenciación de células T ingenuas en células efectoras (IL17A, IL17F, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL22 etc.) principalmente a través del camino JAK-STAT. (5) Estas células actúan además sobre los queratinocitos, lo que resulta en la producción de citoquinas, AMPs e interleucinas implicadas en la psoriasis. (6) TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-22, IL-26 y otros estimulan a los queratinocitos para que aumente la producción de citoquinas y moléculas de adhesión, que a su vez atraen a los neutrófilos y T linfocitos que lleva a la amplificación de la inflamación. [Tomada de Singh et al. 2019]TNF: Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , OHC: ovario de hámster chino.*

### **3.1.3 Moléculas inmunoreguladoras**

La magnitud de la respuesta inmunológica está determinada por el equilibrio entre las señales reguladoras positivas y negativas. Por lo tanto, los diferentes mecanismos inmunosupresores son esenciales para mantener un nivel efectivo de respuesta inmunológica en diferentes condiciones patológicas sin causar daño a los tejidos, y también para preservar la homeostasis en condiciones fisiológicas. El sistema inmunológico es capaz de prevenir y erradicar infecciones graves y también combatir tumores mediante mecanismos efectores.

Sin embargo, cuando el sistema inmunológico no está regulado, puede causar un daño considerable y provocar fenómenos de autoinmunidad. El sistema inmunológico es o debería ser tolerante a los antígenos propios. Así, la tolerancia inmunológica puede definirse como un estado de falta de respuesta a las moléculas que el sistema inmunológico tiene la capacidad de reconocer y atacar. En otras palabras, aunque nuestro sistema inmune tiene receptores para autoantígenos durante el reordenamiento de los genes receptores de antígeno, las células que

expresan estos receptores se eliminan activamente o se les impide funcionar a través de moléculas reguladoras.

A lo largo de la evolución, hemos desarrollado múltiples "puntos de control o *immune checkpoints*" para prevenir los potenciales efectos devastadores de la autoinmunidad.

Las células T, células coordinadoras de la respuesta inmune, se hacen inicialmente tolerantes a los autoantígenos en el timo. En el procedimiento de selección negativa, toda célula T que muestran tendencia a la auto reactividad, es decir, que muestra que se une con alta afinidad a auto péptidos presentes en el timo, son eliminadas en un proceso conocido como tolerancia central.

Sin embargo, no es posible que todos los péptidos propios sean expresados en el timo, por lo que algunas células T autorreactivas escapan de la selección negativa. Para las células T potencialmente autorreactivas que llegan a la periferia, hay al menos cuatro potenciales bloqueos que impiden la estimulación y progresión de la respuesta inmune.

- La primera forma de evitar la activación de las células T autorreactivas es favoreciendo el secuestro del antígeno propio. Como ejemplo, algunas moléculas, como el ADN, normalmente están escondidas dentro de las células por la pared nuclear. Si se filtran fuera de las células, como durante la muerte de las mismas, el ADN es rápidamente eliminado por el complemento. En el curso normal de los acontecimientos, las células T autorreactivas puede que nunca encuentren un antígeno específico si está protegido u oculto como es el caso de los sitios de privilegio inmune. El privilegio inmunológico puede ser debido a barreras físicas que impiden el acceso a los linfocitos o anticuerpo, como por ejemplo, la barrera hematoencefálica, que evita el paso de células del sistema inmunológico al tejido cerebral, o alternativamente, dispositivos moleculares en algunos tejidos; como en los testículos, donde las células

testiculares expresan Fas, lo que induce la apoptosis en cualquier célula T con la que entren en contacto.

- Algunas células T autorreactivas consiguen entrar en los tejidos que expresan antígeno específico, y aquí son los mecanismos de tolerancia periférica los que impiden a estas células T responder. Las células T autorreactivas requieren además de la unión de su receptor TCR con la molécula MHCII, o la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 (B7) o CD40. La activación de estas puede ser inhibida mediante moléculas inmunosupresoras como CTLA-4, que impide la progresión de la respuesta inmune, en un mecanismo denominado anergia celular.
- Las células T autorreactivas que escapan a los dos mecanismos previos, pueden ser finalmente frenadas por los linfocitos T CD4 reguladores, también llamados células T reguladoras (Treg), que aparecen en clones específicos inhibitorios para el antígeno idéntico que causa la estimulación en primera instancia. Estas Treg inhiben las células T efectoras por un gran número de mecanismos, incluida la secreción de citoquinas inhibitorias como IL-10 o TGF- $\beta$ .
- Por último, la muerte celular inducida por activación ocurre en las células T que han sido expuestas repetidamente en el tiempo al mismo antígeno, típicamente un autoantígeno. Estas células T empiezan a expresar tanto Fas y Fas ligando (FasL) y son eliminadas mediante apoptosis.

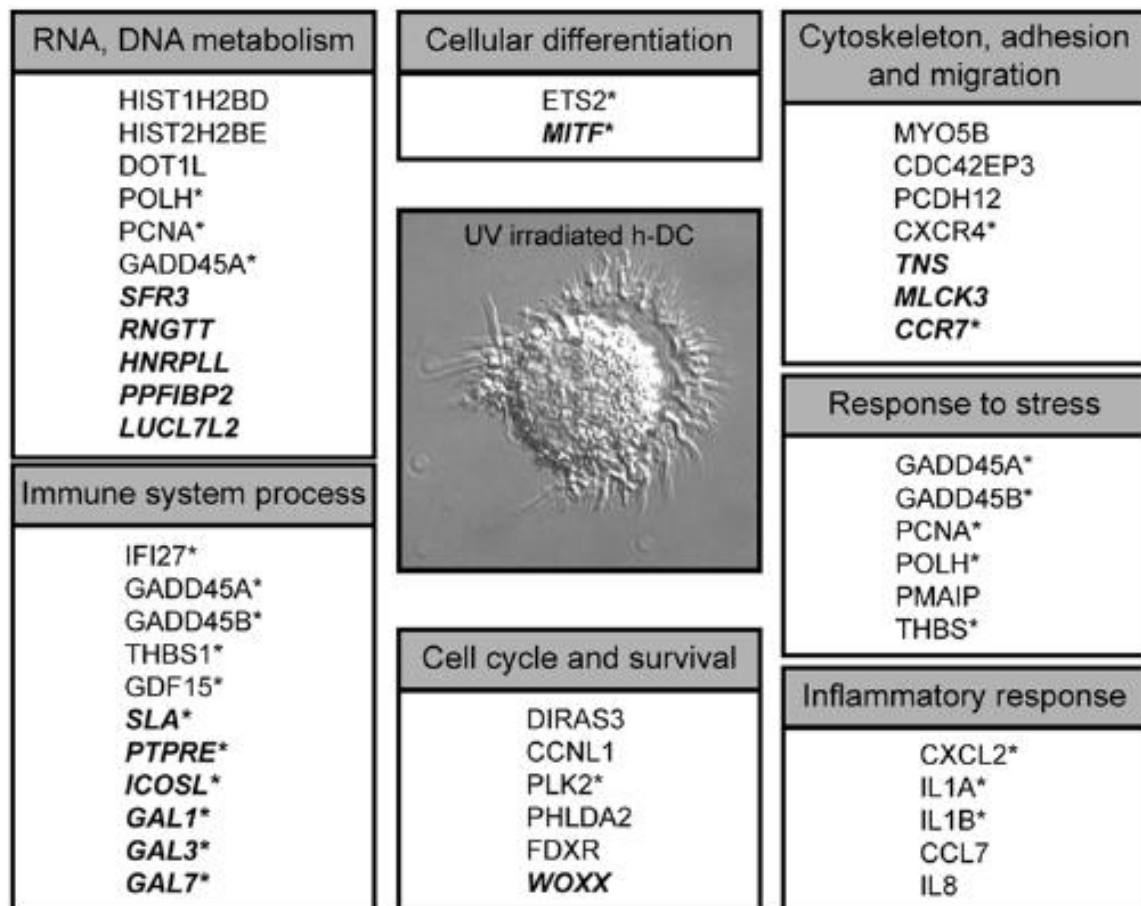
Durante los últimos años, numerosos esfuerzos de grupos de investigación, incluido el nuestro, se han centrado en la comprensión de los mecanismos que regulan la respuesta inmunológica y que secundariamente regulan o modifican a las propias moléculas reguladoras descritas en los últimos párrafos. Múltiples receptores de superficie celular, proteínas solubles y moléculas de señalización proporcionan potenciales señales críticas para limitar la respuesta inmunológica. Algunas de estas moléculas muestran función reguladora negativa bien caracterizada, como las

citoquinas TGF-beta y IL- 10 [Yang et al., 2010, Ouyang et al., 2011, de la Fuente et al., 2012].

Las nuevas moléculas caracterizadas en el control de la respuesta inmune con un papel clave en la regulación del sistema inmunológico, incluyen los receptores PD-1 (programed cell death1), CTLA-4 (TLinfocito citotóxico Antígeno 4), galectinas o la enzima intracelular IDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa). Los fármacos que presentan estas moléculas como diana terapéutica han sido el último gran hito en oncología médica que ha supuesto una revolución en el tratamiento del cáncer de pulmón, urológico y el melanoma. Además de estas moléculas existen otras proteínas con actividad inmunoreguladora menos estudiadas como CD69, AhR, TSP-1 o GADD45 (Proteínas inducibles de arresto del crecimiento y daño de ADN 45 o *Growth Arrest and DNA Damage inducible protein 45*). Todas ellas han surgido como objetivos potenciales para la regulación del equilibrio de activación/supresión de las células inmunes, y así mismo todas ellas son parte de la compleja red de señalización en las que la desregulación de una de estas moléculas a menudo altera la expresión y/o la función de otras inclinando la balanza hacia la tolerancia inmunológica o la inflamación [de la Fuente et al., 2012].

La luz ultravioleta (UV) se ha utilizado como un tratamiento eficaz para la psoriasis a lo largo de los siglos y su efecto sobre el ciclo celular, la expresión y la secreción de citoquinas, es decir, su papel inmunoregulador podría ser importante para su eficacia terapéutica. En la piel psoriásica se producen efectos moleculares inducidos por la luz ultravioleta independientes de los daños en el ADN nuclear, y estos implican receptores de membrana y vías de señalización molecular que regulan la actividad transcripcional. Sin embargo, las dianas celulares y los mecanismos efectores de la fototerapia aún no se han dilucidado por completo [Honigsmann, 2011]. Se ha descrito que la radiación UV induce en las DCs una disminución de la expresión de las moléculas involucradas en la captura de antígenos como DC-SIGN, así como la secreción de TNF-alfa y de IL-10 por las DCs, pero no de IL-12 [Mittlebrun

et al., 2005]. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la exposición a la luz UV modula la expresión en DCs de varias proteínas implicadas en las actividades inmunorreguladoras de estas células (Figura 10) [de la Fuente H et al., 2009].



**Figura 10: Resumen de los genes modificados en las DCs en respuesta a la irradiación UV.** Los genes regulados a la baja o al alza en DC humanas irradiadas por UV, en comparación con las DC no irradiadas, se agruparon por grupos funcionales, utilizando designaciones de Ontología Genética (WebGestalt) y se publicaron. Los genes en negrita y cursiva corresponden a los genes de regulación descendente. (\*) Genes seleccionados para corroborar por PCR. Tomado de [de la Fuente et al., 2009].

Algunas de estas moléculas, como GADD45A y TSP-1 han sido implicadas en procesos autoinmunes. Con el punto de partida del vínculo entre estas moléculas y la regulación inmunológica, así como la angiogénesis, planteamos la posibilidad de que

podrían ser evaluadas como moléculas implicadas en la patogenia de la respuesta inflamatoria exacerbada característica de la psoriasis.

### **3.1.4 TSP-1**

La trombospondina-1 (TSP-1) es una glicoproteína con propiedades antiangiogénicas [Lawler et al. 2000, Baezinger et al. 1971]. La TSP-1 es producida y secretada por las plaquetas y múltiples células primarias: músculo liso vascular [Isenberg et al. 2006], células endoteliales [Phelan et al. 1998] y epiteliales [Rogers et al. 2012], fibroblastos [Dameron et al. 1994] y queratinocitos [Wikner et al. 1987] en respuesta al estrés, así como por células inmunitarias innatas (DCs, macrófagos y células T) cuando son activadas por citoquinas pro-inflamatorias. [DiPietro et al. 1993, Li et al., 2002].

En la piel, la TSP-1 se encuentra en la membrana basal del epitelio glandular en la unión dermoepidérmica, así como en pequeños vasos y se une a las proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, lamininas) y a los receptores de la superficie celular ( $\alpha 3 \beta 1$ ,  $\alpha 5 \beta 3$ , CD47, CD36). En la última década se encontraron datos sobre el papel de la TSP-1 en la respuesta inmunológica [Doyen 2013, Derks 2007]. Por un lado, se sabe que la TSP-1 regula la conversión del factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) de una forma latente a una forma activa [Crawford 1998]. En este sentido, es importante señalar como se ha mencionado previamente, que el TGF-  $\beta 1$  es un potente inhibidor del crecimiento de los queratinocitos, y que su vía de señalización está regulada a la baja en la piel psoriásica, lo que conduce a una proliferación celular anormal debido a una disminución funcional de la regulación del crecimiento. La TSP-1 también puede tener propiedades de supresión independientes del TGF-  $\beta 1$  por su interacción con receptor CD47 en las células T [Li et al., 2002]. La TSP-1 endógena producida durante la activación de las DCs regula negativamente la IL-12, TNF-  $\alpha$  y la liberación de IL-10 a través de sus interacciones con CD47 y CD36 [Doyen et al. 2013, Avicé et al. 2000, Johansson et al. 2004]. Se ha

descrito también el efecto antiproliferativo sobre los linfocitos T CD4+ a través de la interacción TSP-1/CD47 [Marteau 2005]. Así, la TSP-1 promueve la generación de células T reguladoras periféricas humanas a través de la unión a CD47 induciendo a las células T naïve o de memoria CD4+ CD25- T a convertirse en supresoras [Grimbert et al 2006]. Las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos humanos producen espontáneamente TSP-1, sin embargo, esta producción se ve potenciada por estímulos microbianos [Doyen et al. 2013]. En células dendríticas la TSP-1 es un regulador autocrino negativo. A pesar de la importancia de la TSP-1 no sólo como factor antiangiogénico sino también como molécula inmunomoduladora, su estudio en psoriasis es casi insignificante. En 1994 Nickoloff, et al describieron que los queratinocitos de la piel psoriásica mostraban una reducción de siete veces en la producción de TSP-1. En este estudio, la actividad angiogénica presente en los queratinocitos de los pacientes psoriásicos fue suprimida añadiendo TSP-1 altamente purificada [Nickoloff et al 1994].

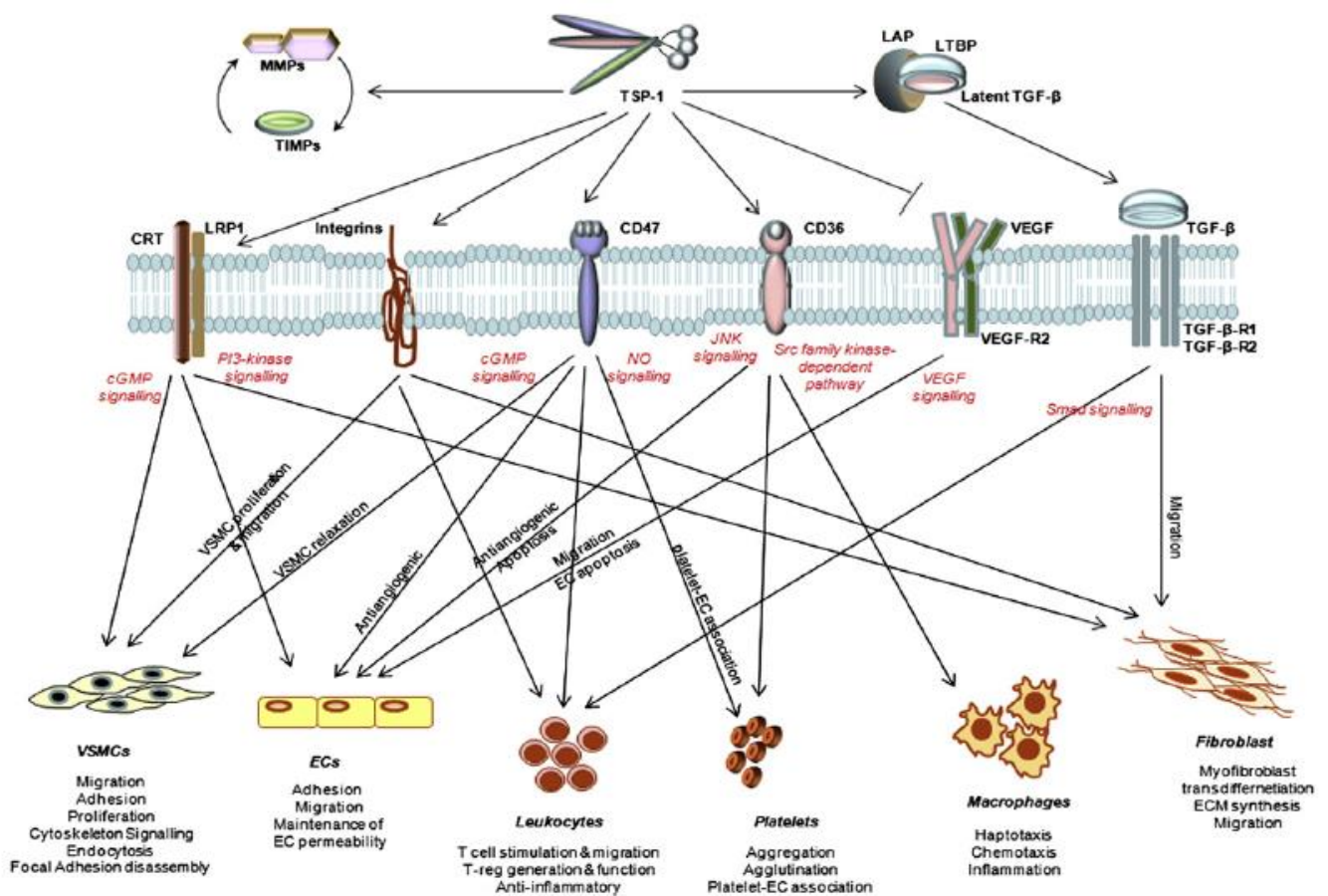
Cabe destacar también la importancia de la proteína de superficie celular CD47 (también conocida como proteína asociada a la integrina, IAP). Se trata de un receptor de la proteína reguladora de la señal  $\alpha$  (SIRP- $\alpha$ ) [Sarfati et al., 2008] que juega un papel importante, aunque no comprendido del todo, en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. CD47 interactúa con varios miembros de la familia de la TSP, específicamente con las TSP-1, TSP-2 y TSP-4 [Isenberg et al. 2009]. Sin embargo, los estudios de unión sugieren que las interacciones de la TSP-2 y la TSP-4 con el CD47 son relativamente débiles, siendo la TSP-1 el ligando soluble de alta afinidad para de CD47 [Isenberg et al. 2009]. Las propiedades antiangiogénicas y sus efectos sobre el la inmunopatogenia de la enfermedad hacen de la TSP-1 y el CD-47 dos moléculas muy atractivas para estudiar en pacientes con psoriasis.

Por otro lado, la interacción de la TSP-1 con el receptor CD36 es responsable de la mayoría de las funciones antiangiogénicas e inflamatorias exhibidas por la TSP-1 [Dawson et al. 1997, Yamuchi et al., 2002]. El receptor CD36 se expresa en una gran



variedad de células y varios estudios han demostrado que la TSP-1 desempeña un papel importante en el reclutamiento de monocitos y macrófagos en sitios de lesión o inflamación de tejidos [Agah et al., 2002, Mansfield et al., 1994, Martin-Manso et al., 2008 and Daniel et al., 2007]. La interacción TSP-1 /CD36 también participa en la señal co-estimuladora necesaria para la activación de las CPA [Masli et al. 2006]. Por otro lado, varios estudios han demostrado que la interacción TSP-1 /CD36 inhibe la migración y la quimiotaxis hacia las células endoteliales de mediadores inflamatorios [Willis et al., 2000, Nesselroth et al., 2001, Lee et al., 2003]. Por último, se ha atribuido a la TSP-1 un papel antiangiogénico en la pared vascular. La inhibición de la angiogénesis por la TSP-1 se produce por la unión de la TSP-1 a CD36 en las células endoteliales, lo que conduce a su apoptosis [Roberts et al., 2007]. En resumen, estos estudios muestran que los niveles circulantes de la TSP-1 son suficientes mediante su interacción con CD36 para limitar las respuestas angiogénicas mediante la antagonización de las señales de varios factores angiogénicos [Bongrazio et al., 2006].

La interacción de TSP-1 con sus principales receptores se resume en la Figura 11.



**Figura 11: Visión general de los receptores de la TSP-1, las vías celulares y los tipos de células influenciadas por la TSP-1.** El diagrama esquemático muestra las principales vías de señalización y tipos de células activadas por TSP-1. Los principales efectos de la TSP-1 incluyen: i) La TSP-1 mantiene el equilibrio entre las MMP y la TIMPs manteniendo la reparación de la matriz; ii) La TSP-1 libera el TGF latente-β de LAP y LTBP y activa la vía de señalización TGF-β/Smad a través de los receptores TGFBR1 y TGFBR2; iii) la TSP-1 activa el complejo CRT/LRP1 que activa el cGMP y el fosfoinositido 3 cinasa (PI 3 cinasa) vías de señalización; iv) la TSP-1 activa varias integrinas y vías descendentes, lo que afecta a la respuesta de múltiples tipos de células; v) la TSP-1 se une a uno de sus principales receptores CD47 y activa varias células mediante la señalización del monofosfato de guanosina cíclica (cGMP) y el óxido nítrico (NO); vi) la TSP-1 se une a otro importante receptor CD36 que provoca diversas respuestas celulares a través de vías dependientes de la cinasa de la familia Src (SFK) o de la cinasa terminal Jun NH2

(JNK); vii) la TSP-1 inhibe la angiogénesis a través del VEGF y su receptor. Las múltiples vías de señalización influenciadas por la TSP-1 afectan a múltiples tipos de células vasculares endoteliales, lo que indica el papel dependiente del contexto que exhibe la TSP-1. MMP = matrix metalloproteinase; TIMP = tissue inhibitor of matrix metalloproteinase; LAP = latency associated peptide; LTBP = latent TGF binding protein; TGF- $\beta$  = transforming growth factor- $\beta$ ; CRT = calreticulin; LRP1 = low density lipoprotein receptor-related protein-1; NO = Nitric oxide; VEGF = vascular endothelial growth factor; VSMCs = vascular smooth muscle cells; Smad = Sma and Mad Related Family; ECs = endothelial cells; ECM = extracellular matrix. Tomado de [Krishna et al. 2013]

### **3.1.5 GADD45a**

La familia de los genes GADD45 descubierta en 1988 por Fornace y colaboradores [Fornace et al., 1988] constituye un grupo de genes que actúan como sensores de estrés y modulan la respuesta de las células de mamíferos al estrés ambiental o fisiológico y a la formación de tumores, donde desempeñan un papel fundamental a través de la reparación del ADN, la detención del ciclo celular y la apoptosis [Fornace et al., 1992, Liebermann et al., 2002, Hoffman et al., 2007]. También se han visto implicados en la embriogénesis permitiendo la proliferación y limitación programada en la organogénesis [Schüle KM 2019].

Tres miembros de esta familia han sido identificados en células de mamíferos, GADD45-alfa (GADD45a), GADD45-beta (GADD45b), y GADD45-gamma (GADD45g) y existe evidencia creciente de su participación en la función de los linfocitos T. Se ha descrito que la deficiencia de GADD45b en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> afecta a su respuesta a la estimulación del TCR o a las citoquinas inflamatorias. Además, las DC deficientes en GADD45b muestran una reducción en la producción de IL-12 e IL-6,

mientras que los ratones deficientes para esta molécula muestran una respuesta Th1 deteriorada [Lu et al. 2004]. Aunque GADD45b no se expresa en células T *naïve*, se induce en respuesta a la activación T o a la estimulación con IL-12, y hay evidencia de su participación en la producción de IFN- $\gamma$  inducido por IL-12 e IL-18 [Yang et al. 2001].

A diferencia de los otros dos miembros de la familia, el GADD45a se expresa en las células T en reposo, así como en muchos otros tejidos. En el contexto inmunológico, se ha descrito como un regulador negativo de la proliferación de células T inducida por la activación, y los ratones GADD45a (-/-) desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmune, similar al lupus eritematoso sistémico humano [Salvador et al. 2002].

El GADD45a actúa también promoviendo la de-metilación del ADN de otras proteínas implicadas en las respuestas al estrés, incluyendo PCNA, p21, Cdc2/CyclinB1, MEKK4, y p38 quinasa [Barreto et al. 2007], como se demostró en ratones GADD45a -/- que muestran un fenotipo de hipermetilación, asociado con una menor expresión de las proteínas *target* [Engel 2009]. Además, el GADD45a ha sido descrito como un regulador negativo de la proliferación de células T inducida por la activación de p38, un mediador bien caracterizado como señalizador de estrés celular y que participa en las vías pro-inflamatorias mediante TNF- $\alpha$  e IL-1. Es importante destacar que la p38 también se activa en respuesta a la señalización del receptor de célula T y participa en la diferenciación Th1 por un mecanismo de activación que involucra la cascada de fosforilación de la vía clásica de la MAPK [Rincon 2003]. En este contexto, ratones GADD45a KO desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmune muy similar al lupus eritematoso sistémico humano [Salvador et al 2002]. La activación de la vía alternativa de activación de la p38 se ha encontrado recientemente en pacientes con AR activa en comparación con pacientes en remisión. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión del GADD45a entre pacientes con AR activa o en

remisión [Lopez-Santalla 2011]. Este estudio establece la importancia de la vía alternativa p38 en la activación de las células T en pacientes con AR y señala la posible inhibición de esta vía como diana terapéutica para disminuir la actividad de la p38.

Como se mencionó antes, datos previos de nuestro grupo demostraron que la expresión de GADD45a se induce en respuesta a la radiación UV tanto en células dendríticas, como en melanocitos y queratinocitos. En este sentido, el GADD45a induce la apoptosis y la detención del ciclo celular al mantener la activación de p38 y c-JNK MAPK en los queratinocitos con daño celular (las llamadas "células quemadas por el sol" o "*burn out cells*"). Su ausencia da como resultado la pérdida de la actividad sostenida del p38/JNK MAPK más allá de los 15-30 minutos después de la radiación UV, lo que conduce a una activación inadecuada del p53 y a la pérdida de la activación normal de los puntos de control de los G (1) y G (2) del ciclo celular. La pérdida de GADD45a reduce drásticamente el número de estos queratinocitos apoptóticos dañados por los rayos UV ("*burn out cells*") y en consecuencia los ratones GADD45a-null son más propensos a tener tumores secundarios a mutaciones por radiación UV [Hidelsheim 2002]. El estudio del ciclo celular en queratinocitos deficientes o no en GADD45a ha demostrado que la actividad de la quinasa Cdc2 disminuye después de la irradiación con UV en células normales, pero no en las células deficientes de GADD45a. Las células GADD45a-deficientes tienen una tasa más lenta de reparación de la escisión de nucleótidos. La falta de detención de G2/M junto con la reducción de la reparación del ADN conduce a una mayor sensibilidad ultravioleta de las células deficientes de GADD45a. Estos resultados revelan que el GADD45a promueve la detención del G2/M a través de la exportación nuclear y la actividad de la quinasa del Cdc2, aumenta la reparación del ADN genómico global e inhibe la muerte celular en los queratinocitos. Por lo tanto, el GADD45a juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad genómica de la piel expuesta a los rayos ultravioletas. [Maeda et al., 2002].

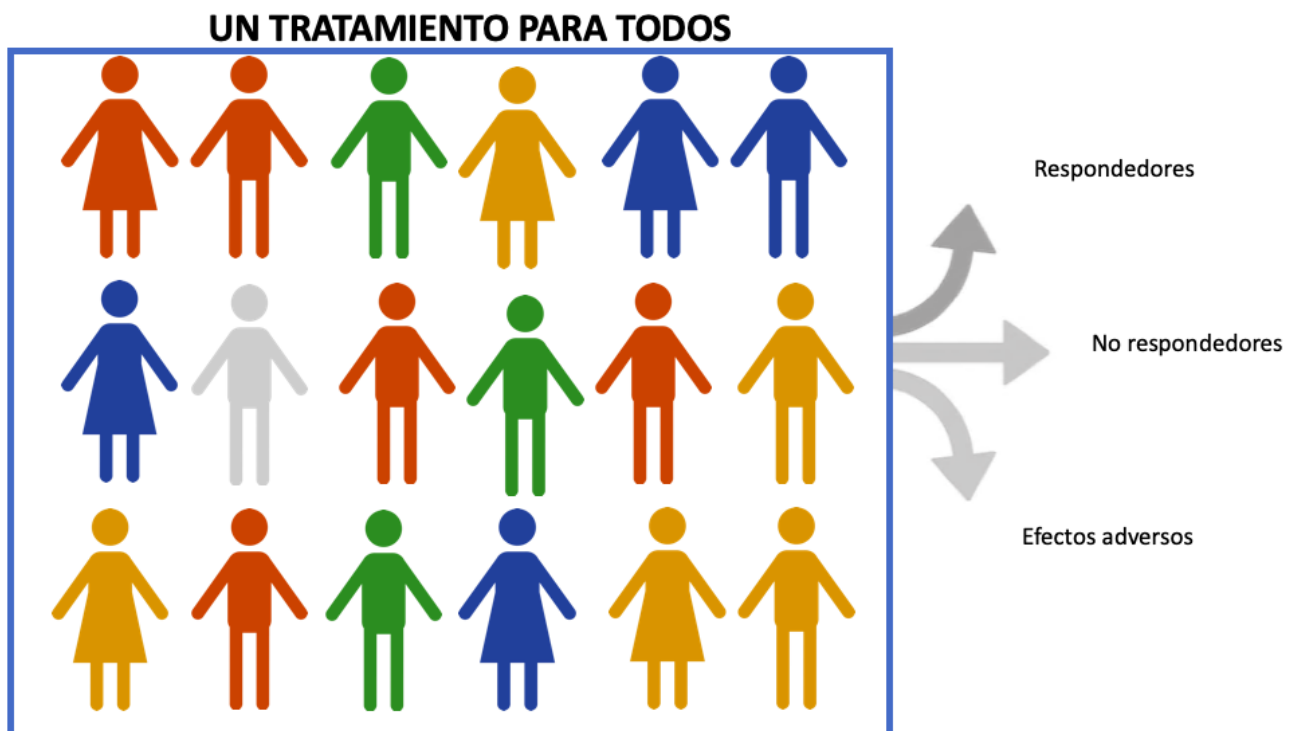
De manera similar, en otro estudio de carcinoma de células escamosas de la piel, el GADD45a demostró de nuevo ser un componente clave para proteger la piel contra los tumores inducidos por la radiación UV. En este estudio, el silenciamiento de GADD45a en ratones resultó en un aumento en el número y tamaño de tumores. Las células silenciadas para GADD45a mostraron un aumento en la expresión de la ciclina B1, MMP-2, Bcl-2, p53, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , y VEGF. La apoptosis celular y la senescencia fueron inhibidas, mientras que la viabilidad y proliferación celular aumentaron después del tratamiento con GADD45a. Los resultados revelan por tanto que el silenciamiento con GADD45a aumenta la proliferación de células tumorales y reduce la apoptosis y la senescencia a través de la vía de señalización p53 [Liu et al. 2018].

Como podemos ver, los miembros de esta familia de proteínas, y en especial la GADD45a, están involucrados en varios eventos clave asociados con la psoriasis, si bien su papel exacto no ha sido estudiado hasta la fecha, pero la evidencia indirecta previamente descrita indica que podría estar implicado en su regulación.

## 4. Justificación.

A lo largo de los años, se han identificado múltiples biomarcadores para la psoriasis (Tabla 2 material suplementario). Sin embargo, a pesar de los grandes avances en el conocimiento de la patogénesis de la psoriasis durante los últimos años, determinar qué tratamiento puede ser el más efectivo y predecir la respuesta a una determinada terapia en un determinado paciente son cuestiones aún por resolver.

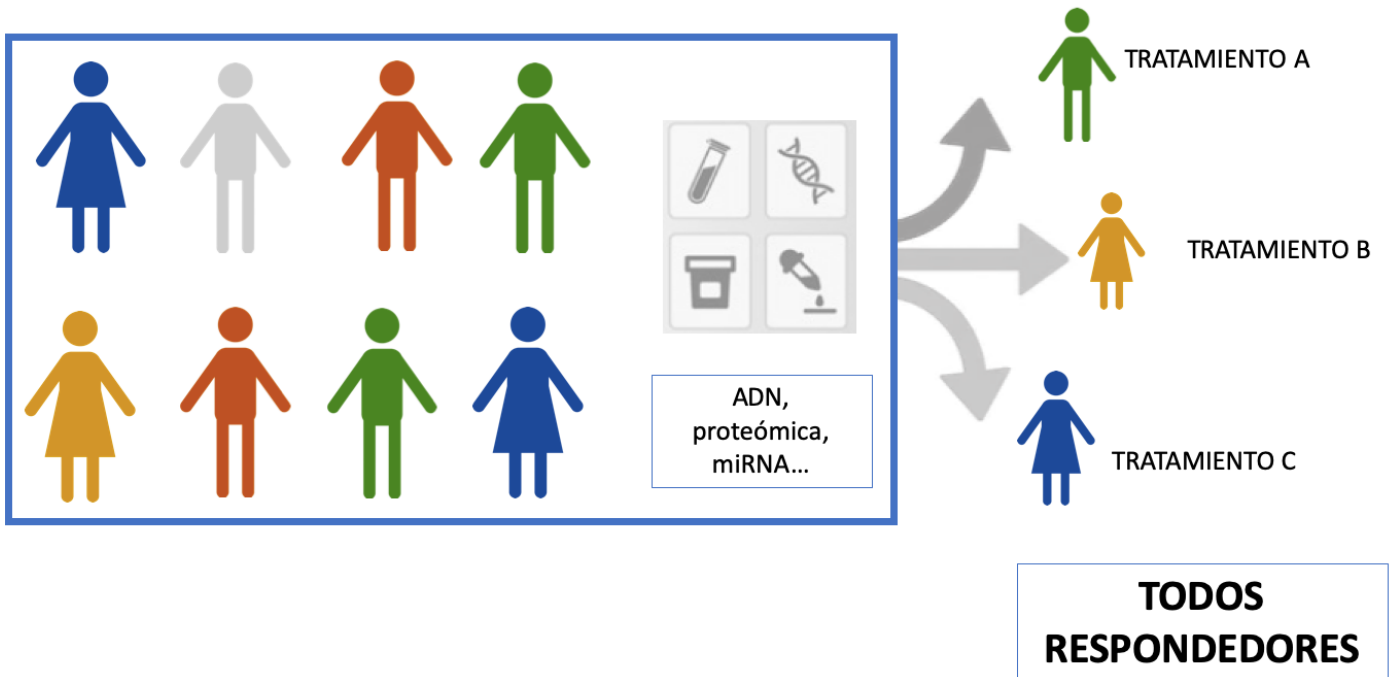
La ausencia de la identificación de moléculas que sirvan claramente como marcadores de diagnóstico, seguimiento y pronóstico que puedan ser usados con claridad en la práctica clínica habitual justifica la necesidad de estudiar nuevas moléculas que nos permitan estratificar el riesgo individual de nuestros pacientes, así como predecir la respuesta terapéutica y poder aplicar una medicina más personalizada e individualizada a cada paciente (Figuras 12 y 13).



**Figura 12: Situación actual de la terapéutica.** Con un mismo tratamiento encontramos subgrupos de pacientes respondedores, no respondedores y pacientes

*con mayor tendencia a realizar efectos adversos de manera dependiente o independiente a la respuesta terapéutica.*

## MEDICINA PERSONALIZADA



**Figura 13: Utilidad de la medicina personalizada.** Con biomarcadores de respuesta pueden recomendarse tratamientos individualizados a un paciente específico, prediciendo una respuesta terapéutica adecuada sin efectos adversos.



## **5.Objetivo general del estudio**

1. En este trabajo, buscamos el papel del eje de señalización de TSP-1 y de GADD45a en el desarrollo y mantenimiento de las lesiones psoriásicas.

## **6. Parte I: Estudio del papel de trombospondina-1 en la respuesta inflamatoria de la psoriasis**

### **6.1. Objetivos:**

- I. Determinar los niveles de expresión de TSP-1 y CD47 en piel lesional y piel no lesional de pacientes con psoriasis y compararlos con la piel de controles sanos.
- II. Determinar los niveles de expresión de TSP-1 y CD47 en linfocitos T CD4+ periféricos y DCs derivadas de monocitos en suero y compararlos con controles sanos.
- III. Determinar la expresión de la proteína CD47 en pDCs y mDCs de sangre periférica en pacientes y en controles sanos.
- IV. Determinar el papel de TSP-1 y CD47 en la diferenciación de linfocitos T CD4+ periféricos hacia Th17 o Treg en pacientes y en controles sanos.
- V. Determinar el papel funcional de TSP-1 expresado en las células dendríticas y en los linfocitos T CD4+ en ensayos de activación celular.

### **6.2. Material y métodos**

- **Pacientes**

Este estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional /Comité de Ética Independiente del Hospital de la Princesa de acuerdo con la Declaración de Principios de Helsinki, realizando las actualizaciones periódicas necesarias.

Después de dar el consentimiento informado, se incluyeron 20 personas sanas y 30 pacientes psoriásicos no tratados. Los pacientes eran elegibles para el estudio si tenían un PASI  $\geq 8$ . Se establecieron los siguientes períodos de lavado: 14 días para los corticoesteroides tópicos, 28 días para el tratamiento sistémico que incluye

corticoesteroides, metotrexato, ciclosporina, acitretina o fototerapia y 3 meses para los agentes biológicos. De cada paciente con psoriasis se tomaron dos biopsias cutáneas no expuestas al sol (10 mm), una de piel psoriásica lesional y otra de piel aparentemente sana (piel no lesional). Al mismo tiempo se obtuvieron 20 ml de sangre venosa periférica. Se obtuvieron muestras de piel normal sobrante y muestras de sangre venosa periférica de 20 pacientes quirúrgicos. Cada biopsia se cortó por la mitad; un trozo se congeló a presión para aislamiento de ARN y el otro se incrustó en el compuesto OCTTM (Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL®) y se almacenó en -80°C hasta su procesamiento para la inmunofluorescencia.

- **Expresión de TSP-1 y ARNm de CD47 Niveles por RT-PCR**

Los niveles de expresión de los ARNm de TSP-1 y CD47 se determinaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). El total de ARN fue aislado de muestras de piel, sangre periférica CD4+ Células T y MDCS usando el reactivo Trizol® (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un microgramo de ARN fue transcrito en sentido inverso al ADNc y amplificado con los pares de *primers* (TSP-1 *forward* GCC ACA GTT CCT GAT GGA G, *reverse* CCA TGG AGA CCA GCC ATC; CD47 *forward* TCC ACA GCA CAG CCA AGG T, *reverse* TCG CAG ATG ACT TGA GAG TGA AC) usando el GoTaq qPCR Master Mix® (Promega, WI USA). Los datos fueron analizados con el software StepOne Plus® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Los niveles de mRNA de TSP-1 y CD47 se normalizaron a los niveles controlados de GAPDH.

- **Tinción de inmunofluorescencia**

Las secciones OCT de la piel de 5µm fueron fijadas (formaldehído 4%), permeabilizadas (Tritón X-100 0,2%) y bloqueadas con 100µg/ml de gammaglobulina humana (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) con una dilución 1:100 de suero de burro (Sigma-Aldrich) en solución tampón de fosfato (PBS). Las secciones de piel se

incubaron durante la noche con 5µg/ml de anticuerpos de origen bovino anti CD47 humana (sistemas de I+D, Cat. AF4670) y ratón anti-humano CD45, seguidos de burro anti oveja (DAS) Alexa Flúor 488 y burro anti-ratón (DAM) Alexa Flúor 555. Finalmente, los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Se realizaron controles negativos con omisión del anticuerpo primario. Las secciones fueron examinadas con un microscopio de inmunofluorescencia Leica DMR® en las mismas condiciones de adquisición. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (<http://imagej.softonic.com>). Para el análisis de la expresión de CD47, se determinó la intensidad de la fluorescencia en las regiones de interés (ROI) dibujadas en las células CD45+.

- **Células T CD4+ de sangre periférica y CD derivadas de monocitos (moDCs)**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) se obtuvieron por centrifugación de gradiente de densidad y luego se aislaron las células T CD4+ por selección negativa utilizando microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Para los moDC, se permitió que los PBMNC se adhirieran durante 30 minutos a 37Cº, y las células adheridas con plástico se cultivaron durante 5 días en un medio completo complementado con 500 U/ml GM-CSF (Peprotech) y 10 ng/ml IL-4 (sistemas de I+D). El día 6, se añadieron 10 ng/ml de LPS y después de 24 h se cosecharon las células.

- **Ensayos de diferenciación de Th17 y Treg**

Para la diferenciación de Th17, se cultivaron células T CD4+ durante 10 días con anti-CD3 (BioLegend Cat# 300314, RRID:AB314050) más anticuerpos anti-CD28 (BD, Cat#555725) (en 5µg/ml y 2µg/ml, respectivamente) en presencia de la combinación de citoquinas y anticuerpos bloqueadores apropiados para la polarización: rhIL-6 h IL-1b (10 ng/ml), rhIL-23 (20 ng/ml), rhTGF-b1 (2 ng/ml), anti-IFN-g (10µg/ml) y anti-IL-4 (10µg/ml). Para la polarización Treg, se cultivaron células con TGF-b (5 ng/ml) y

IL-2 (20 U/ml) (todas citoquinas de sistemas de I+D) durante 5 días. Cuando se indicó hTSP-1 (5µg/ml), también se añadió el control del isotipo de ratón antihumano CD47 (1µg/ml) clon B6H12.2 (Abcam Cat# ab3283, RRID:AB303671) o IgG1. El porcentaje de células IL-17+ y FoxP3+ CD25+ (Treg) se midió en un citómetro FACS Canto® y se analizó con el software FlowJo®.

- **Transfección de siRNA**

Las transferencias se realizaron utilizando el Nucleofector 4-D y el kit de células primarias P3 (Amaxa Lonza, Colonia, Alemania). Se transfirieron células T CD4+ no estimuladas o moDCs inmaduras ( $1 \times 10^6$  células) con siRNA específico de la TSP-1 (50 pmol) seleccionando el protocolo EO-115 del 4-D Nucleofector para las células T CD4+ y el protocolo CM-120 para los moDCs. Inmediatamente después de la nucleofección, las células fueron incubadas en el medio X-VIVO 15 (Lonza, Bélgica).

- **Ensayo de reacción leucocitaria mixta (MLR)**

Las células T CD4+ fueron co-cultivadas con moDCs de un donante diferente en placas de fondo en U de 96 pocillos en el medio X-VIVO 15. La proporción de moDCs y células T CD4+ fue de 1:5. Los linfocitos T CD4+ fueron precargados con CellTrace Violet (Invitrogen, de Thermo Fisher Scientific, OR USA) para seguir la proliferación celular. Las células fueron cultivadas durante 5 días, luego la producción de citoquinas intracelulares y la dilución de CellTrace Violet fue evaluada por citometría de flujo.

- **Ensayos de supresión de Treg**

Después de 5 días de diferenciación, las células Treg fueron aisladas usando cuentas magnéticas y agregadas a cultivos MLR (proporción 1:2). Las células T CD4+

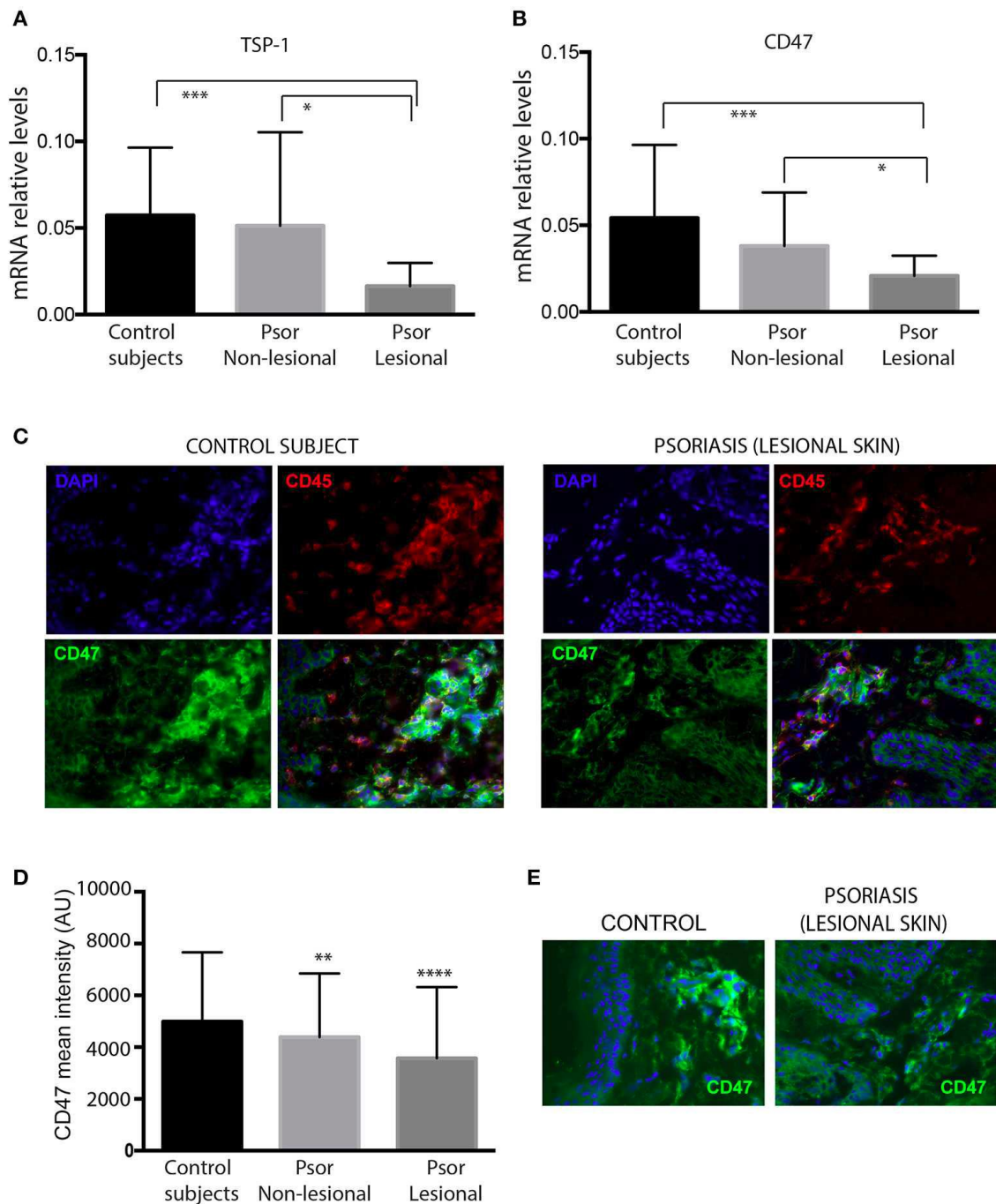
respondedoras eran del mismo donante de células Treg. Inmediatamente antes del co-cultivo, las células T respondedoras fueron cargadas con CellTrace Violet, mientras que las células Treg fueron cargadas con CFSE (Invitrogen). Después de 5 días de cultivo, la proliferación de células respondedoras fue evaluada por citometría de flujo.

- **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados con el Prisma GraphPad (Software GraphPad, San Diego, CA, USA). Para determinar diferencias entre dos grupos se utilizó la prueba de U de Mann Whitney, para diferencias entre más de dos grupos la prueba de Anova de 1 vía. En el caso de datos pareado, se analizó usando la prueba de rangos de Wilcoxon. Los datos de los ensayos de diferenciación de células T fueron analizados usando la prueba de Friedman y la comparación múltiple de Dunn. Se utilizó la prueba de Spearman para el análisis de correlación. Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0,05$ .

### **6.3. Resultados**

La expresión de la TSP-1 y CD47 fue analizada por RT-PCR en muestras de piel de pacientes con psoriasis y controles sanos. Nuestros datos mostraron que la piel lesional de los pacientes con psoriasis expresa niveles más bajos de TSP-1 y CD47 en comparación con la piel no lesional o la piel de los sujetos de control (Figuras 14 A, B). Los ensayos de inmunofluorescencia mostraron que el CD47 se expresa en la dermis y la epidermis tanto de las muestras de piel de control como de las de psoriasis. Además, la doble inmunotinción con CD45 identificó la expresión de CD47 en el infiltrado leucocitario a nivel de la dermis (Figura 14C). Los análisis cuantitativos demostraron una disminución de los niveles de CD47 en las células dérmicas CD45+ de los pacientes con psoriasis, en comparación con las células de la piel no lesional o la de los sujetos de control (Figura 14D). Por el contrario, no observamos ninguna diferencia en los niveles de CD47 en los queratinocitos entre los pacientes con psoriasis y los controles sanos (Figura 14E).

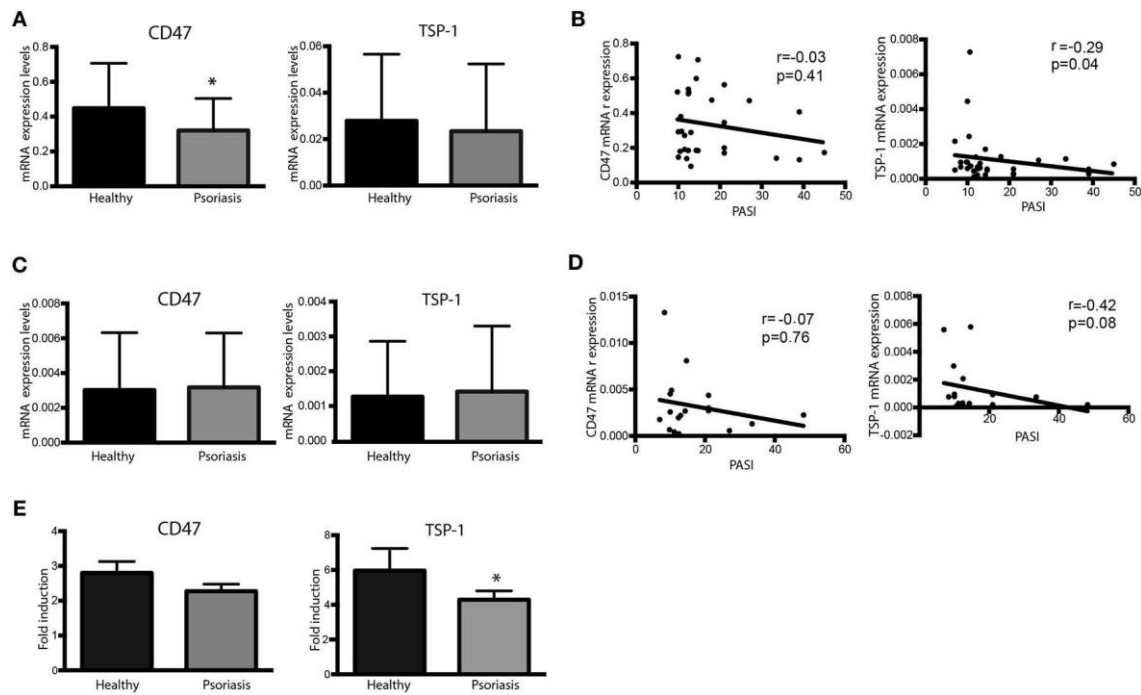


**Figura 14:** Las muestras de piel de pacientes con psoriasis expresan niveles más bajos de TSP-1, y CD47 en comparación con los controles sanos. Los niveles de ARNm de TSP-1 **A**) y su receptor CD47 **B**) fue analizado por RT-PCR en muestras de piel de 26 pacientes con psoriasis y 20 controles sanos. La expresión de GAPDH fue usada para normalizar el gen expresión. Los datos fueron analizados por el ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ . **C**) Doble tinción de inmunofluorescencia de CD47 (verde) y CD45 (rojo) en una



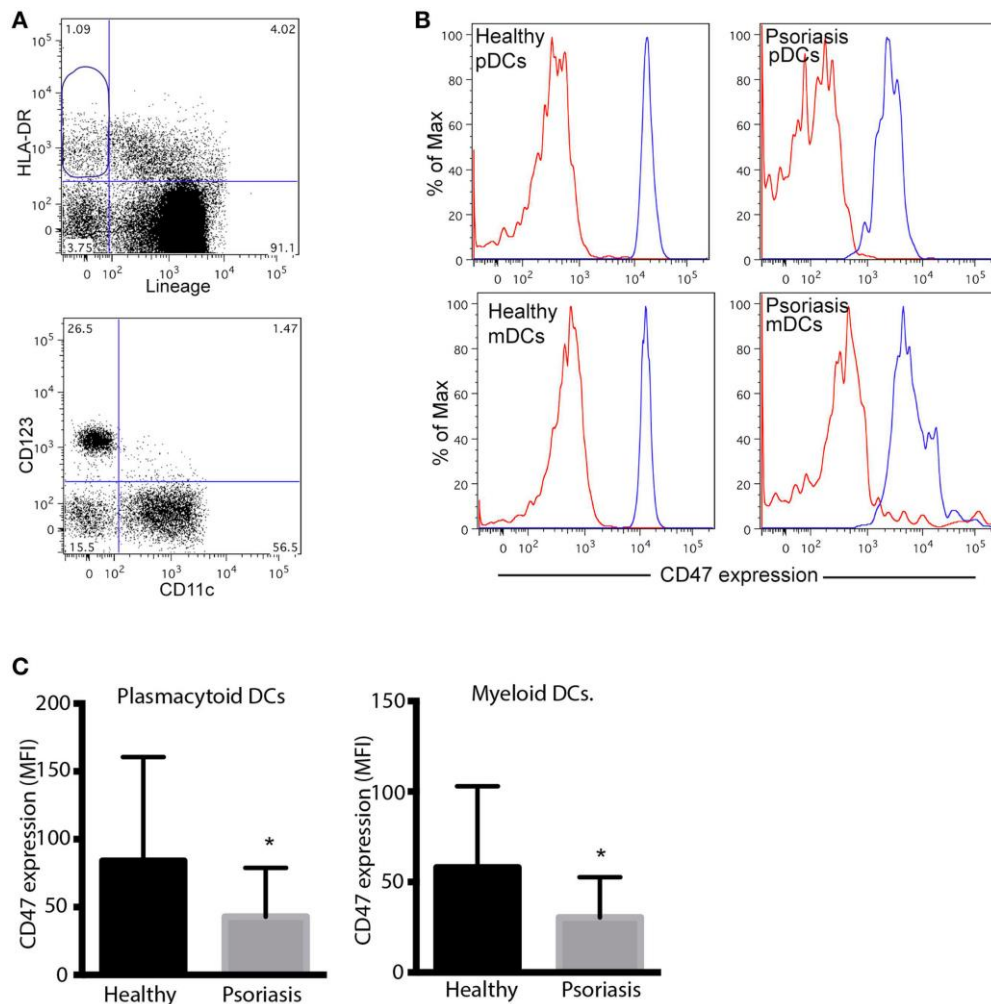
*muestra de piel representativa de los sujetos de control (paneles izquierdos) y piel lesional de los pacientes con psoriasis (paneles derechos). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). D) Para la cuantificación de la tinción por inmunofluorescencia, la intensidad de la fluorescencia de CD47 en las células dérmicas CD45+ fue calculado con el software Image J .E) Expresión representativa de CD47 (verde) en muestras de piel de sujetos de control y pacientes con psoriasis. Los gráficos representan la media  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre los grupos fueron determinadas por la prueba de ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p \leq 0.001$ .*

También se analizó la expresión de CD47 y TSP-1 en las células T CD4+ de la sangre periférica y en las DCs derivadas de monocitos (moDC). Nuestros datos mostraron que las células T CD4+ periféricas de los pacientes con psoriasis expresaron niveles más bajos de CD47 en comparación con los controles sanos (Figura 15A). Aunque nuestros resultados no demostraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de la TSP-1 entre los sujetos sanos y los pacientes con psoriasis (Figura 15A), el análisis estadístico mostró una correlación negativa entre la expresión de la TSP-1 y el PASI (Figura 15B). No obstante, no se observó ninguna correlación entre la expresión de la CD47 y el PASI (Figura 15B). La expresión de la TSP-1 y CD47 también se analizó en los moDC en condiciones basales o después de la activación con LPS. No se observaron diferencias significativas en la expresión basal de la TSP-1 y CD47 entre los pacientes con psoriasis y los controles sanos (Figura 15C). No obstante, de forma similar a nuestros hallazgos en las células T CD4+ periféricas, los niveles de expresión de la TSP-1 en las MDCS inmaduras se correlacionaron negativamente con la PASI (Figura 15D). Curiosamente, la inducción de la TSP-1 en respuesta al LPS fue menor en los moDC de los pacientes de psoriasis en comparación con los controles, mientras que no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión de CD47 en respuesta a LPS (Figura 15E).



**Figura 15: Expresión desregulada de CD47 y TSP-1 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la sangre periférica y en los moDC.** (A, B) Células T CD4<sup>+</sup> de pacientes con psoriasis (n=30) y los controles sanos (n=18) fueron aislados de la sangre periférica usando microesferas magnéticas. A) La expresión de CD47 y TSP-1 fue analizada usando PCR en tiempo real. La expresión GAPDH fue usada para normalizar los datos. Las diferencias entre los grupos se analizaron usando la prueba U de Mann-Whitney. B) La correlación entre la expresión de CD47 y TSP-1 en células T CD4<sup>+</sup> y PASI fue determinada estadísticamente por la prueba de Spearman. C) Expresión basal de CD47 y TSP-1 en moDCs no estimuladas de pacientes y controles. Se aislaron los monocitos de la sangre periférica utilizando microesferas inmunomagnéticas y se diferenciaron a DCs durante 5 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. D) Correlación entre la expresión de CD47 y TSP-1 en las células de las DCs y PASI determinada por la prueba de Spearman. E) Incremento de la expresión de CD47 y TSP-1 en moDCs en respuesta a LPS. Las moDCs fueron estimuladas durante 24 h en presencia de LPS (10 ng/ml), luego se aisló el ARN y la expresión de TSP-1 y CD47 se determinó por RT-PCR. Las veces de inducción (fold induction) se calcularon como expresión con LPS/expresión basal. Las diferencias entre grupos determinaron por la prueba U de Mann-Whitney, \* $p < 0.05$ .

Los niveles de proteína CD47 se evaluaron mediante citometría de flujo en las CDP y los MDCs de pacientes con psoriasis y controles sanos. Los CD se identificaron como células del linaje HLA-DR<sup>+</sup> (CD3, CD14, CD20, CD56) y luego se seleccionaron de acuerdo con la expresión de CD123 y CD11c (CDP y MDCs, respectivamente) (Figura 16A). Aunque los niveles de proteína CD47 eran altos tanto en las CDP como en las MDCs, no detectamos ninguna diferencia significativa en la expresión de CD47 entre ambos tipos de células (Figura 16B). No obstante, ambos subconjuntos de CDDC circulantes de pacientes con psoriasis expresaron niveles significativamente más bajos de CD47 en comparación con las células de sujetos sanos (Figuras 16B, C).



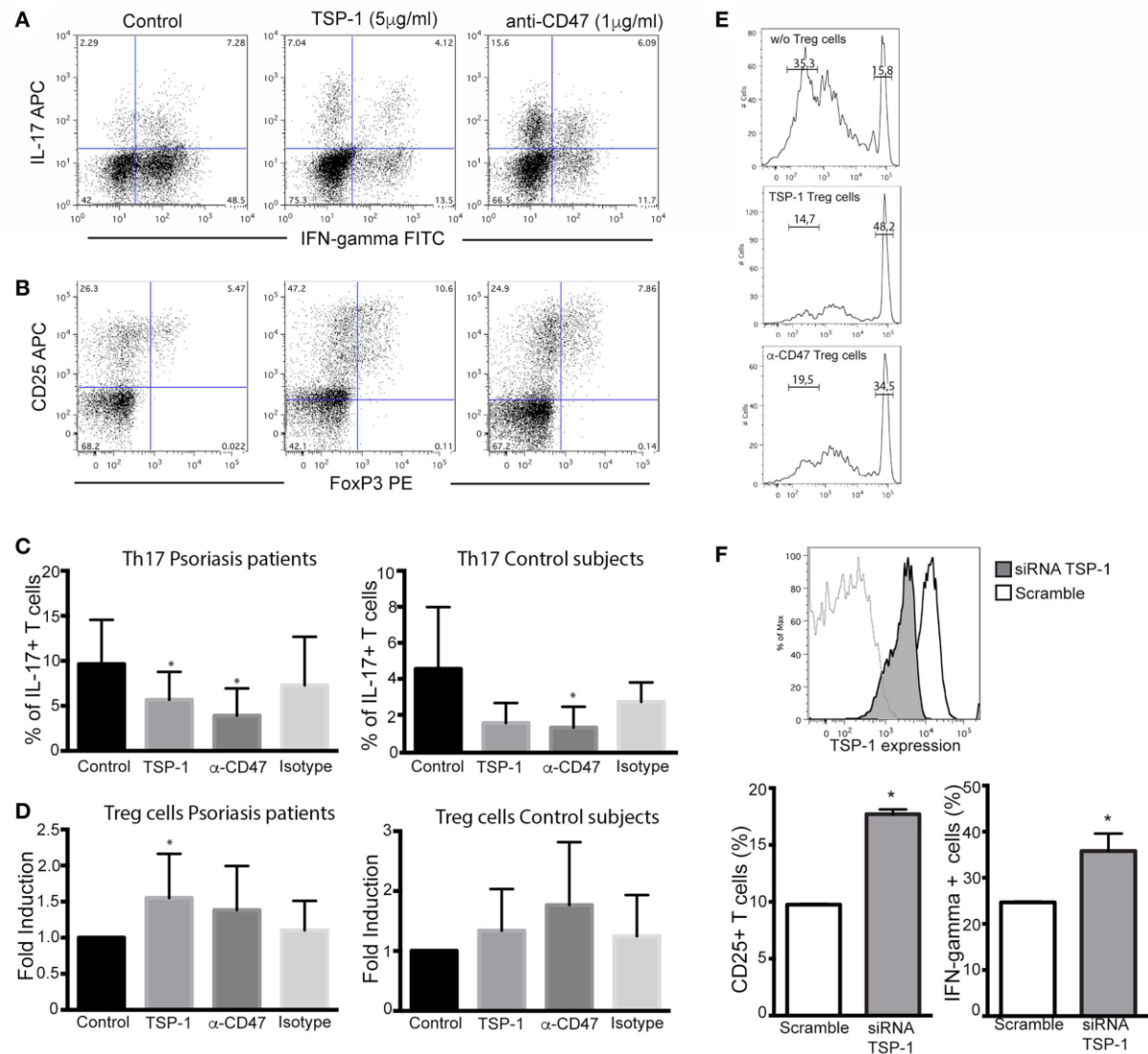
**Figura 16: Las células dendríticas plasmocitoides de la sangre periférica y las células dendríticas mieloides de los pacientes con psoriasis expresan niveles bajos**

**de CD47.** a) La estrategia usada para seleccionar para la detección de CDP y MDCs. Las células dendríticas fueron identificadas como HLA-DR positivas, el linaje (CD3, CD14, CD20, CD56) negativo, la expresión de CD47 fue entonces determinada en CD123+ y CD11c+ por citometría de flujo. b) Histogramas representativos de la expresión de CD47 en CDP y mDCs de un paciente y un sujeto de control. Líneas rojas y azules indica control de isotipo y expresión de CD47, respectivamente. c) La expresión CD47 se calculó como la intensidad media de fluorescencia (IFM) del control del isotipo CD47/MFI. Las barras representan la media  $\pm$  SD de 18 pacientes con psoriasis y 10 sujetos de control. Las diferencias fueron analizadas por la prueba U de Mann-Whitney,  $*p < 0.05$ .

Para evaluar el papel funcional de CD47 y TSP-1 en la respuesta inflamatoria de la psoriasis, realizamos ensayos de diferenciación de Th17 y Treg en células T CD4+ periféricas de pacientes con psoriasis y controles sanos. Las células T CD4+ se incubaron con el correspondiente cóctel de citoquinas, y en presencia de TSP-1 humana o anti-CD47mAb que imita la unión de la TSP-1 [Grimert et al 2006] (Figuras 17A,B). Nuestros resultados demostraron una clara y significativa reducción del porcentaje de células IL-17+ cuando estas células fueron cultivadas en presencia de TSP-1 o anticuerpos anti-CD47 (Figuras 17A,C) en pacientes con psoriasis (prueba de Friedman  $p = 0,003$ ).

Similar a nuestros datos de pacientes con psoriasis, la TSP-1 y el antiCD47 redujo el porcentaje de células IL-17+ en los cultivos celulares de donantes sanos (prueba de Friedman  $p = 0,007$ ) (Figura 17C). Además, evaluamos si la TSP-1 o la anti-CD47 mAb fueron capaces de afectar la diferenciación de Treg. Nuestros resultados mostraron que la adición de la TSP-1 indujo un incremento significativo en el porcentaje de células Treg (CD25+ FoxP3+) en muestras de pacientes de psoriasis (prueba de Friedman  $p = 0,03$ ) (Figuras 17B,D). Aunque observamos una tendencia del anti-CD47 a favorecer la diferenciación de células Treg, las diferencias no eran significativas (Figura 17D).

Para analizar la funcionalidad de las células CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>, probamos su capacidad para suprimir la proliferación de células T. Nuestros datos mostraron que las células CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> diferenciadas en presencia de TSP-1 o anti-CD47 mAb eran capaces de inhibir la proliferación de células T en una reacción leucocitaria mixta (Figura 17E). Para confirmar el papel de la TSP-1 en la activación de las células T CD4<sup>+</sup>, se realizó un silenciamiento mediado por siRNA. Los niveles de la TSP-1 expresados exógenamente se supervisaron mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 17F, los niveles de proteína disminuyeron en presencia de siRNA dirigido a la TSP-1. Tanto la expresión de CD25 como la producción de IFN- $\gamma$  aumentaron claramente en las células T transfectadas con siRNA específico de la TSP-1, cuando se activaron por medio de la TCR (Figura 17F).

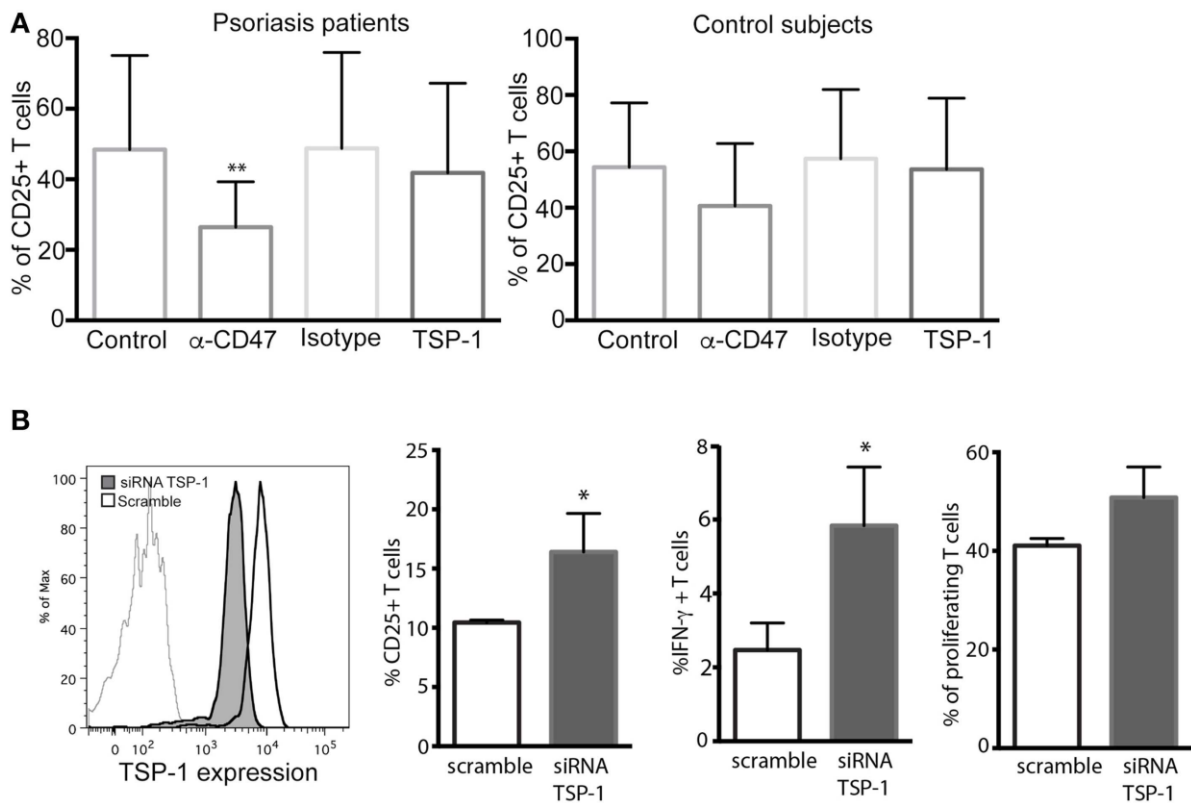


**Figura 17: Efectos funcionales de la TSP-1 en los linfocitos T CD4+ de los pacientes con psoriasis.** (A, B) Gráficas de puntos representativas de los ensayos de diferenciación de Th17 A) y Treg B) en presencia de TSP-1 y anti-CD47 mAb. Se aislaron células T CD4+ de la sangre venosa periférica de pacientes con psoriasis usando microesferas magnéticas. Las células ( $1 \times 10^6$ /ml) fueron diferenciadas a Th17 en presencia o ausencia de anti-CD47 mAb humano 1 $\mu$ g/ml (izquierda) o TSP-1 humano 5 $\mu$ g/ml (centro). **C**) Porcentaje de células T IL-17+ de pacientes con psoriasis ( $n = 13$ ) y sujetos de control ( $n = 5$ ) evaluados por citometría de flujo después de 10 días de cultivo en presencia de TSP-1, anti-CD47 mAb, o control del isotipo IgG1 (1 $\mu$ g/ml). Los datos fueron analizados usando la prueba de Friedman y la prueba de comparación múltiple de Dunn, \* $p < 0.05$ . **D**) Diferenciación de las células Treg en

presencia de anti-CD47 mAb (1 $\mu$ g/ml), TSP-1 (5 $\mu$ g/ml) o control del isotipo IgG1 (1 $\mu$ g/ml) de los pacientes con psoriasis (n = 9) y los sujetos de control (n = 6). Los gráficos muestran la inducción de las células FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en presencia de los estímulos indicados en comparación con las células cultivadas sólo con el cóctel de diferenciación. **E)** Ensayo de supresión de Treg, las células Treg diferenciadas en presencia de TSP-1 o anti-CD47 mAb fueron aisladas por cuentas inmunomagnéticas y añadidas a cultivos de reacción leucocitaria mixta (MLR). El histograma superior corresponde al cultivo de control (moDCs más células T respondedoras), los histogramas central e inferior corresponden a cultivos de MLR más células Treg que se diferenciaron en presencia de TSP-1 o anti-CD47 mAb (los histogramas son representativos de dos experimentos independientes). **F)** El silenciamiento de la TSP-1 de las células T favorece su activación a través del TCR. Histograma que muestra la eficacia de la reducción del ARN de siembra de la TSP-1. Brevemente, células T CD4<sup>+</sup> no estimuladas fueron transfectadas por nucleofección con siRNA específico de la TSP-1 o de control (50 pmol), 24 h después las células T fueron estimuladas con anti-CD3/CD28 + IL-2 durante 48 h. La expresión de CD25 y la producción de IFN- $\gamma$  fueron evaluadas por citometría de flujo. Los datos corresponden a uno dos experimentos independientes realizados por triplicado. Las diferencias se comprobaron mediante la prueba de Mann-Whitney, \*p < 0,05.

Por último, se evaluó el papel del eje de señalización de la TSP-1/CD47 en ensayos de presentación de antígenos con cultivos autólogos de moDC con linfocitos T CD4<sup>+</sup> y utilizando la expresión de CD25 como marcador de activación. Estos ensayos demostraron que los mAb anti-CD47 impedían claramente la activación de las células T CD4<sup>+</sup> durante la presentación del Ag (Figura 18A) en las células de los pacientes con psoriasis. No obstante, la adición de la TSP-1 humana no tuvo efectos significativos en la expresión de CD25 (Figura 18A). No se observaron diferencias significativas en los co-cultivos de las células de los sujetos de control (Figura 18A). Estos hallazgos contrastan con los observados en la diferenciación y activación de las células T (Figura 17). El efecto de la TSP-1 exógena podría ser dependiente de la

dos, y también es importante señalar que el anti-CD47 (clon B6H12.2) no sólo imita la unión de la TSP-1 sino que bloquea también la unión de la SIRP alfa [Latour 2001] expresada en CD. Así pues, para dilucidar si la TSP-1 expresada por los DC estaba desempeñando un papel en la activación de las células T CD4+, la expresión endógena de la TSP-1 fue silenciada en los moDC mediante siRNA. La activación de células T en ensayos de reacción mixta leucocitaria, evaluada como expresión de CD25, producción y proliferación de IFN- gamma, se incrementó en presencia de moDCs transfectados con siRNA de la TSP-1 (Figura 18B). Estos datos demuestran que la TSP-1 expresada por los moDC está implicada en la activación de las células T CD4+.





**Figura 18: La señalización de CD47/TSP-1 evita la activación de los linfocitos T CD4+ en un ensayo de presentación de antígenos. A)** La expresión de CD25 de los linfocitos T CD4+ después de la presentación del antígeno, las DCs derivados de monocitos de pacientes con psoriasis (n = 8) y los controles sanos (n = 3) se cultivaron durante 3 días con células T CD4+ autólogas de sangre periférica en presencia de enterotoxina E de estafilococos. Cuando se indicó, se añadieron anti-CD47 (1µg/ml), control del isotipo IgG1 (1µg/ml) o TSP-1 (5µg/ml). Luego se evaluó la expresión de CD25 mediante citometría de flujo. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SD y las diferencias fueron probadas usando la prueba de Friedman,  $**p < 0.01$ . **B)** El silenciamiento de la TSP-1 de los moDC aumenta la activación de las células T después de la presentación de la Ag. Histograma que muestra la eficacia del silenciamiento de TSP-1 mediante siRNA. Brevemente, las moDCs inmaduras fueron transfectadas por nucleofección con siRNA específico de la TSP-1 o una secuencia control (50 pmol), después de 48 h las moDCs fueron estimuladas con LPS (10 ng/ml) durante 12 h y luego co-cultivadas con células T CD4+ heterólogas. Los datos corresponden a uno de tres experimentos realizados por triplicado. Las diferencias fueron analizadas usando la prueba de Mann-Whitney,  $*p < 0.05$ .

## **7. Parte II: Estudio de GADD45 alfa y su función de de-metilación en psoriasis**

### **7.1. Objetivos:**

- I. Determinar los niveles de expresión GADD45a mediante RT-PCR en biopsias de piel de pacientes con psoriasis y sujetos control por RT-PCR e inmunofluorescencia.
- II. Estudiar si existe una correlación entre los niveles de expresión GADD45a y la expresión de moléculas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ ).
- III. Analizar la expresión de GADD45a en las células T de la sangre periférica y las moDCs de pacientes con psoriasis y controles sanos.
- IV. Estudiar la expresión de GADD45a tras la activación de las células T CD4<sup>+</sup> y las moDCs.
- V. Analizar la expresión de p38 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la sangre periférica de los pacientes y los controles mediante citometría de flujo.
- VI. Determinar la expresión de ubiquitina C-terminal hidrolasa 1 (UCHL1), proteína diana de GADD45a (en muestras de piel y células inmunes de sangre periférica de pacientes con psoriasis y controles sanos).

### **7.2. Material y métodos**

- **Pacientes**

Este estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional /Comité de Ética Independiente del Hospital de la Princesa de acuerdo con la Declaración de Principios de Helsinki, realizando las actualizaciones periódicas necesarias. Después de dar el consentimiento informado (ver Anexo I), se inscribieron 20 personas sanas y 30 pacientes psoriásicos no tratados. Los pacientes podían participar en el estudio si tenían un Índice de Gravedad de Evaluación de la Psoriasis (PASI)  $\geq 8$ . Se

establecieron los siguientes períodos de lavado: 14 días para los corticoesteroides tópicos, 28 días para el tratamiento sistémico que incluye corticoesteroides, metotrexato, ciclosporina, acitretina o fototerapia y 3 meses para los agentes biológicos. De cada paciente con psoriasis se tomaron dos biopsias cutáneas no expuestas al sol (10 mm), una de piel psoriásica lesional y otra de piel aparentemente sana (piel no lesional). Al mismo tiempo se obtuvieron 20 ml de sangre venosa periférica. Se obtuvieron muestras de piel normal sobrante y muestras de sangre venosa periférica de 10 pacientes quirúrgicos. Cada biopsia se cortó por la mitad; un trozo se congeló a presión para el aislamiento del ARN, y el otro se incluyó en la TCO y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento para la inmunofluorescencia.

- **RT-PCR.**

Los niveles de expresión de ARNm de GADD45a, UCHL1 e IFN-g se determinaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). El ARN total se aisló de muestras de piel, células T CD4+ de sangre periférica y moDCs utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen ®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un microgramo de ARN se transcribió en sentido inverso al ADNc y se amplificó con los pares de cebadores específicos utilizando GoTaq qPCR Master Mix (Promega, WI USA). Los datos se analizaron utilizando el software StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Los niveles de GADD45a, GADD45b, UCHL1 y IFN-g se normalizaron a los niveles de GAPDH.

- **Tinción por inmunofluorescencia**

Las secciones de TCO de la piel de 5 µm fueron fijadas (formaldehído 4%), permeabilizadas (Tritón X-100 0,2%) y bloqueadas con 100 µg/ml de gammaglobulina humana (Sigma-Aldrich ®, St Louis MO, USA) y una dilución 1:100 de suero de burro (Sigma-Aldrich®) en solución tampón de fosfato (PBS). Las secciones de piel se incubaron durante la noche con 5 µg/ml de GADD45a anti-humano de cabra y CD45 anti-humano de ratón, seguido de Fluor Alexa 488 anti-cabra (DAG) y Fluor Alexa 555 anti-humano (DAM). Finalmente, los núcleos celulares fueron

teñidos con DAPI. Se realizaron controles negativos con omisión del anticuerpo primario. Las secciones fueron examinadas con un microscopio de inmunofluorescencia Leica DMR en las mismas condiciones de adquisición. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (<http://imagej.softonic.com>). De manera similar, se analizaron los niveles de CD47 en las regiones de interés (ROI) extraídas para las células CD45+.

- **Células T CD4+ de sangre periférica y CD derivadas de monocitos (moDC).**

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) por gradiente de densidad y se aislaron las células T CD4+ por selección negativa utilizando microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec Bergisch®, Gladbach, Alemania). Donde se indica, las células T CD4+ fueron incubadas durante 24 horas en presencia de IL-12 (10ng/ml) más IL-18 (10ng/ml). En el caso de los moDC, se permitió que los PBMC se adhirieran durante 30 minutos a 37°C, y las células adheridas al plástico se cultivaron durante 5 días en medios completos complementados con 500 U/ml GM-CSF (PeproTech®) y 10 ng/ml IL-4 (sistemas de I+D). El día 6, se añadieron 10 ng/ml de LPS y después de 24 h se cosecharon las células.

- **Expresión de pTyr180 Trp183 en células T CD4+ por citometría de flujo.**

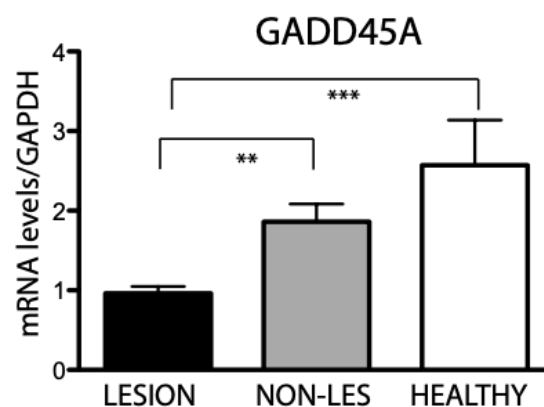
Las células T CD4+ aisladas fueron incubadas con anti-CD3/CD28 (10 ug/ml y 5 ug/ml respectivamente) durante 30 min a 4°C y luego con anti-ratón Fc durante 30 min adicionales a 4°C y luego inmediatamente incubadas a 37°C. Después de 15min, las células fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con p38 anti-humano de ratón (Becton-Dickinson) siguiendo las instrucciones del fabricante y analizadas en un citómetro de flujo FACScanto.

- **Análisis estadístico.**

Los datos fueron analizados con el Prisma GraphPad (GraphPad Software®, San Diego, CA, USA). La prueba de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney se utilizaron según convenía. Cuando se indicó, se utilizó la prueba de rango firmado de Wilcoxon para analizar los datos emparejados. La prueba de Spearman se utilizó para el análisis de correlación. Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0,05$ .

### 7.3. Resultados

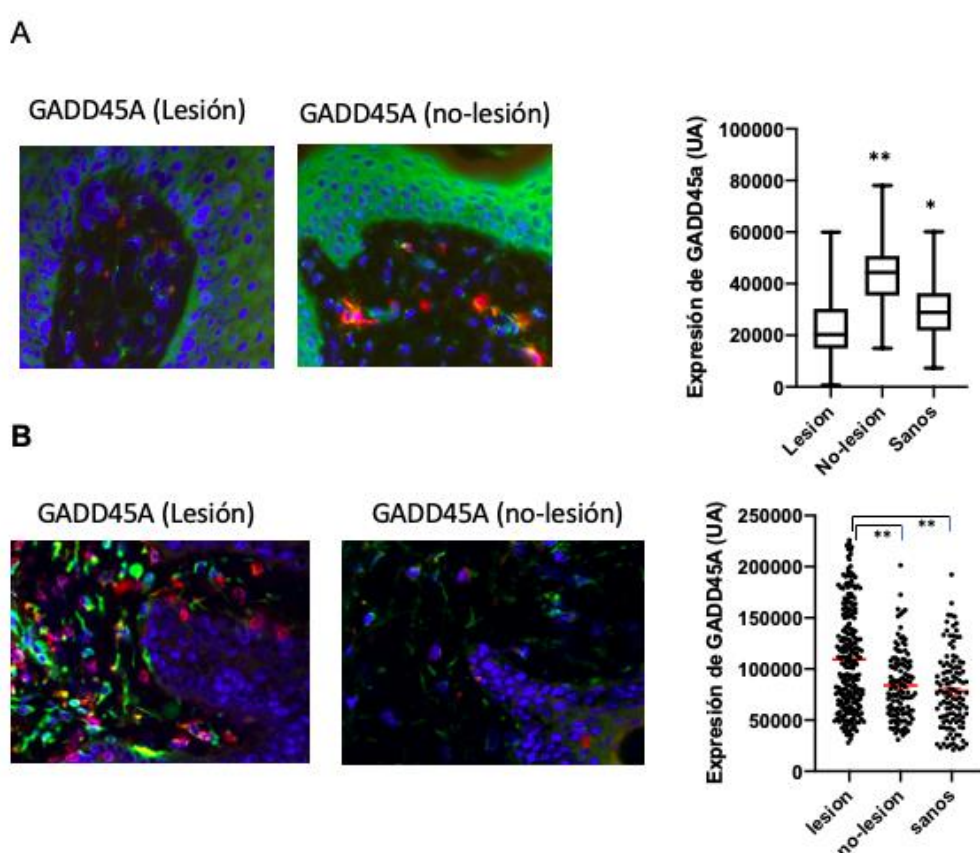
Se analizó la expresión de GADD45a en muestras de piel de pacientes de psoriasis (piel lesional y piel no lesional), así como en biopsias de piel de sujetos de control. Nuestros datos mostraron que la piel lesional de los pacientes con psoriasis expresa bajos niveles de GADD45a en comparación con la piel no lesional o la piel de controles (Figura 19).



**Figura 19: Niveles disminuidos de ARNm de GADD45A en piel lesional.** Análisis RT-PCR en muestras de piel de 30 pacientes con psoriasis y 20 sujetos sanos. La GAPDH se utilizó para normalizar la expresión de los genes. Los datos fueron analizados por

un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, \*\*\*  $p < 0.001$  \*\*  $p < 0.01$

Dado que las proteínas GADD45a se expresan ampliamente, decidimos analizar su patrón de expresión mediante ensayos de inmunofluorescencia. Se detectó la expresión de GADD45a en los queratinocitos (Figura 20A) y los leucocitos, como indica la coloración conjunta con CD45 (Figura 20B).



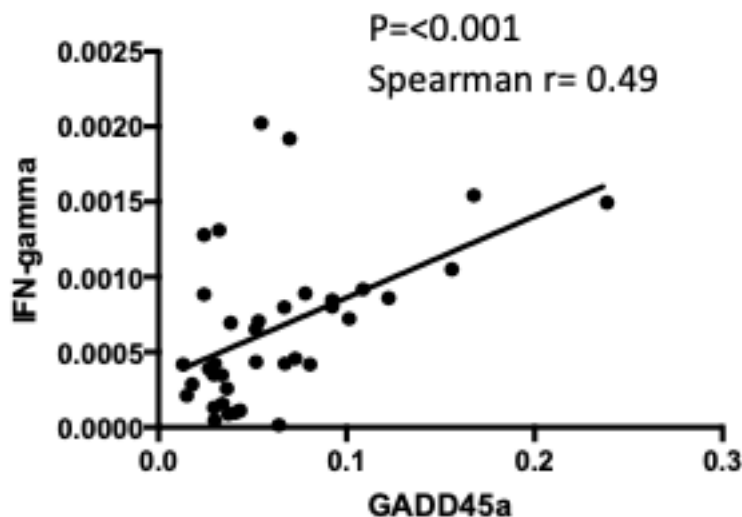
**Figura 20: Expresión del patrón GADD45a en la piel de los pacientes con psoriasis.**

**A)** La tinción de GADD45a (verde) en una muestra de piel representativa de piel lesional y no lesional y la cuantificación de la tinción por inmunofluorescencia, la intensidad de la fluorescencia de GADD45a en las células epidérmicas se calculó utilizando el software Image J. **B):** Doble tinción por inmunofluorescencia de GADD45A (verde) y CD45 (rojo) en una muestra de piel representativa como en A, y cuantificación de GADD45A en células CD45+. Las diferencias entre los grupos se

determinaron mediante un ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey,  $**p<0,01$ ,  $*p<0,05$

Como se muestra en la figura 20, observamos una expresión compleja de GADD45a en las muestras de piel, mientras que la expresión de esta proteína en los queratinocitos disminuyó en la psoriasis, su expresión en los leucocitos del infiltrado inflamatorio aumentó.

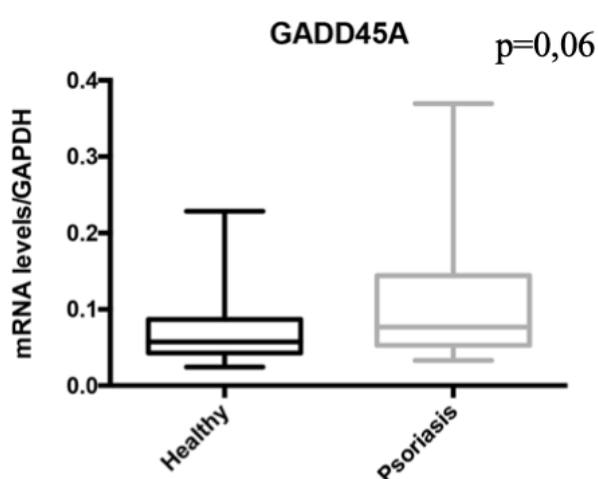
Como se ha señalado anteriormente, se han asociado varios estímulos inflamatorios a la inducción de moléculas de GADD45a. Así pues, nos preguntamos una posible correlación de la expresión de GADD45a con el IFN-g, nuestros datos mostraron una clara correlación positiva entre la expresión de GADD45a y la del IFN-g (Figura 21).



**Figura 21: Correlación entre la inflamación local en piel y los niveles de GADD45a usando IFN-gamma como marcador de la inflamación en la piel. La expresión de GADD45a se correlaciona con el IFN-g en la piel lesional de los pacientes con psoriasis. Se incluyen muestras de piel lesional y no lesional mostrando una**

correlación positiva directa. Los datos fueron analizados usando la prueba de Spearman,  $n=30$ .

También se analizaron las moléculas de GADD45 en las células T CD4<sup>+</sup> de la sangre periférica mediante RT-PCR. Similar a nuestro hallazgo en muestras de piel, nuestros datos mostraron una mayor expresión de GADD45a en las células T de pacientes con psoriasis en comparación con los controles sanos (Figura 22).

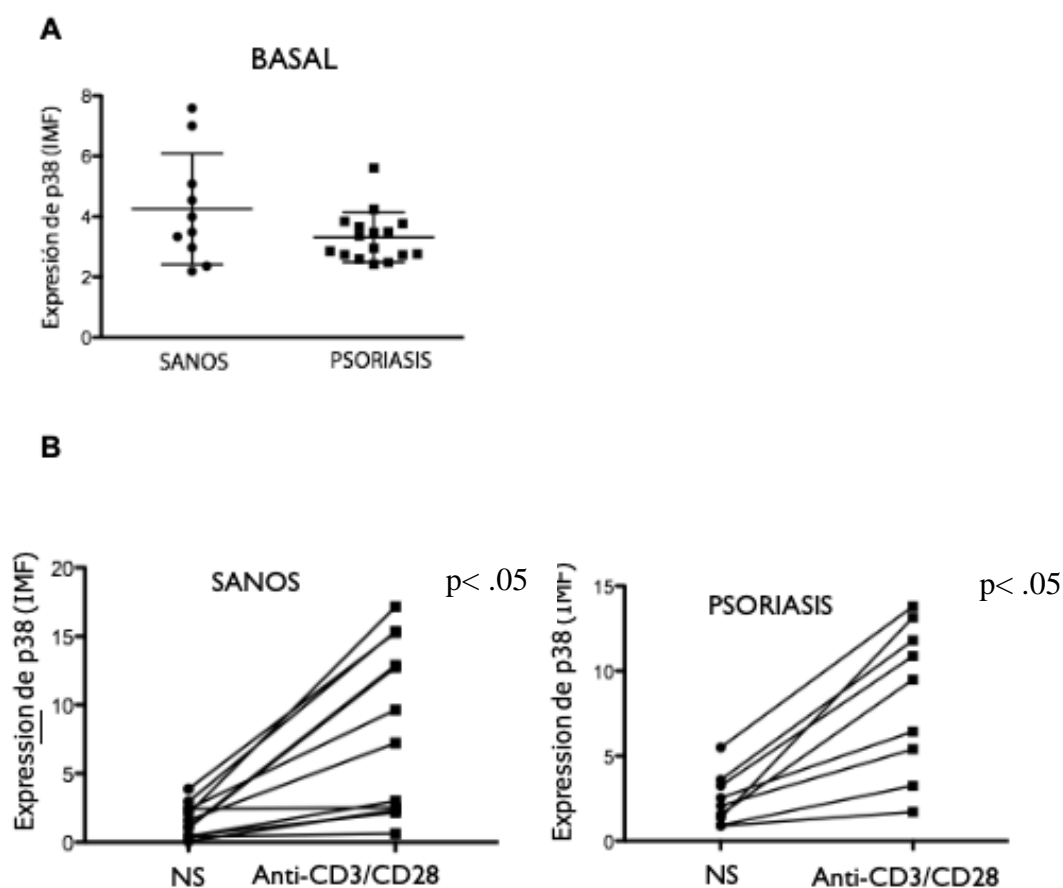


**Figura 22: Las células T CD4<sup>+</sup> de la sangre periférica de la psoriasis expresan altos niveles de GADD45.** Expresión basal de GADD45a en las células T. Se aislaron células T CD4<sup>+</sup> de la sangre periférica utilizando microesferas magnéticas. La expresión de GADD45a se analizó mediante RT-PCR. Se utilizó GAPDH para normalizar los datos. Las diferencias entre los grupos se determinaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

A continuación, nos preguntamos si la expresión diferencial de GADD45a en las células T podría afectar a la vía de señalización de la p38 en los pacientes con psoriasis. Por lo tanto, analizamos la activación de p38 después de la estimulación del receptor de células T en los pacientes y los controles. La activación de p38 en

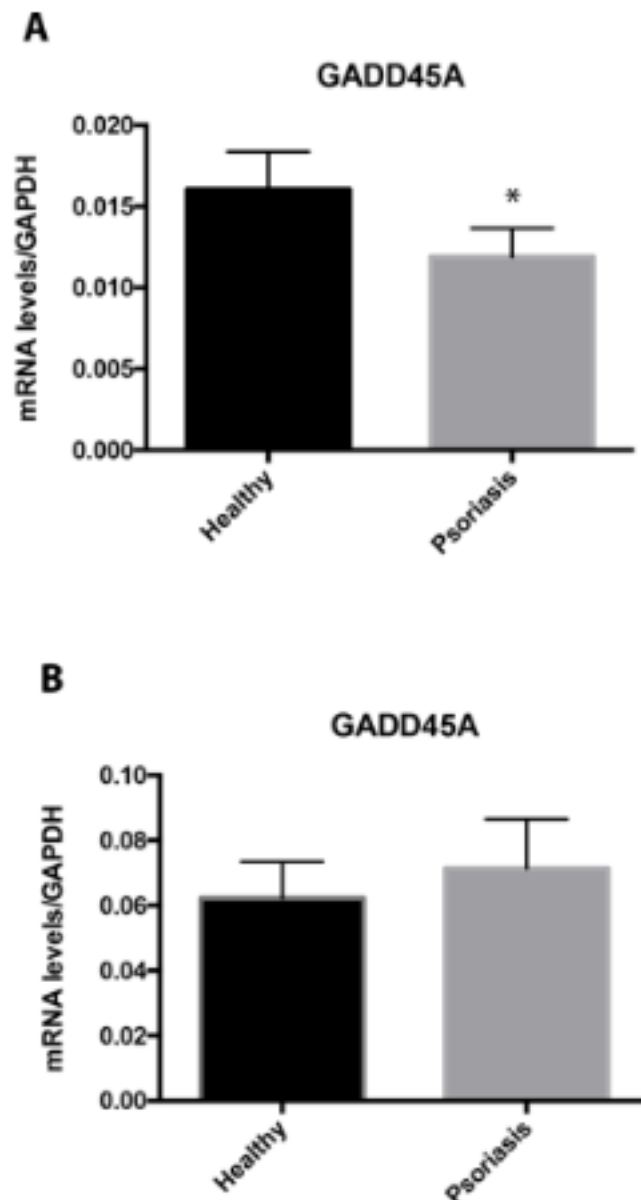


respuesta a la estimulación del receptor de células T fue similar en ambos casos. No se detectaron diferencias estadísticas entre los pacientes y los controles tanto en condiciones basales (Figura 23A) como posterior a la estimulación con CD3 y CD28 (Figura 23B).



**Figura 23: No hay diferencias en la activación de la p38 en las células T CD4+ de los pacientes con psoriasis.** a) La fosforilación dual de p38 fue evaluada por citometría de flujo en células T CD4+ de sangre periférica de pacientes con psoriasis (n=10) y sujetos sanos (n=10) inmediatamente después de su aislamiento. Los datos fueron analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney. b) Activación de p38 antes y después de la estimulación TCR. Las células T fueron o no simuladas (NS) en presencia de anti-CD3 (10ug/ml) más IL-28 (5ug/ml) durante 15 min, luego, la fosforilación dual de p38 fue evaluada por citometría de flujo como en A. Los datos fueron analizados usando la prueba de rango firmado de Wilcoxon.

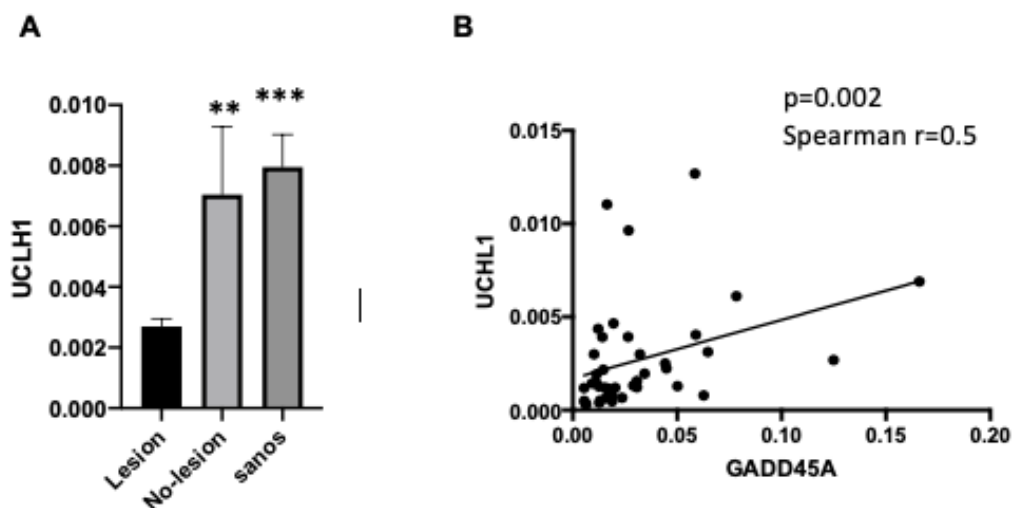
Contrariamente a la expresión de GADD45a en las células T, la expresión de esta molécula se vio disminuida en las moDCs no estimuladas de los pacientes de psoriasis en comparación con los controles sanos (Figura 24A). Sin embargo, no se detectaron diferencias en la expresión de GADD45a tras la estimulación con LPS (Figura 24B).



**Figura 24. Las DCs inmaduras derivados de monocitos expresan niveles bajos de GADD45a en pacientes con psoriasis. A) Expresión basal de GADD45a en células de moDC, que se diferenciaron de los monocitos periféricos como se indica en Material y métodos. La expresión de GADD45a se analizó mediante RT-PCR. Se utilizó GAPDH**

para normalizar los datos. **B)** Expresión de GADD45a en moDCs después de 24h de estimulación con LPS (10 ng/ml). Las diferencias entre los grupos se determinaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

Se sabe que el GADD45a tiene una actividad demetilasa [Barreto et al., 2007] y su ausencia da lugar a una hipermetilación del promotor de varios genes como el de UCHL1 [Mitra et al., 2011]. Por lo tanto, nos preguntamos si la expresión de este gen podría verse afectada en los pacientes de psoriasis. Curiosamente, la expresión del UCHL-1 se vio significativamente disminuida en la piel de las lesiones, en comparación con la piel no lesional de la psoriasis y la piel de los controles sanos (Figura 25A). Además, se observó una correlación positiva entre los niveles de expresión de GADD45a y su proteína target UCHL-1 (Figura 25B).



**Figura 25. La piel lesional de los pacientes con psoriasis expresa niveles bajos de UCHL1 que se correlacionan con los niveles de GADD45a.** **A)** Expresión de UCHL1 en muestras de piel de pacientes con psoriasis (con y sin lesión) y sujetos de control. La expresión del UCHL1 fue analizada usando RT-PCR y los datos fueron normalizados usando GAPDH como control interno. Los datos fueron analizados usando el ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. **B)** Correlación positiva entre los niveles de GADD45a y UCHL1 en la piel lesional de los pacientes con psoriasis. Los datos fueron analizados usando la prueba de Spearman.

Para determinar si la disminución del UCHL1 en la piel de pacientes con psoriasis podría estar mediada por la metilación del ADN, utilizamos conjuntos de datos disponibles públicamente que contienen información de *microarrays* de metilación de muestras de piel de la psoriasis. Analizamos los sitios de metilación diferencial (DMS) entre la piel con psoriasis y los controles centrándonos en aquellos DMS significativos localizados en las islas CpGs en el promotor UCHL1 (Tabla 3). El análisis de estos datos muestra que la mayoría de estos sitios están hipermetilados en muestras de piel de psoriasis con respecto a los controles sanos.

Dataset	Reference	DMS	Location	CpG-site neighborhood	Adj p-value	Gene context	log2 FC	Methylation state
GSE63315 (L vs HC)	1	cg16026922	41259044	Island	1,38E-03	Body	5,68E-02	Hypermethylated
		cg16142306	41258935	Island	1,94E-03	1stExon;5'UTR	3,70E-02	Hypermethylated
GSE73894 L vs HC	2	cg24715245	41258794	Island	1,49E-03	TSS200	-3,22E-02	Hypomethylated
		cg09921610	41259866	Island	6,56E-03	Body	2,95E-02	Hypermethylated
GSE73894 L vs NL		cg09921610	41259866	Island	6,06E-03	Body	-3,50E-02	Hypomethylated
GSE11579 7	3	cg07068756	41258910	Island	1,05E-02	1stExon;5'UTR	7,52E-02	Hypermethylated

**Tabla 3. Sitios de CpG metilados diferencialmente en el promotor UCHL1 en muestras de piel de pacientes con psoriasis.** Ubicación: coordenada genómica\_37 del sitio CpG interrogado por la sonda. Vecindario del sitio CpG: ubicación del sitio o sitios CpG asociados al gen dentro del vecindario del sitio CpG. Contexto genético: ubicación del sitio o sitios CpG asociados al gen con respecto al contexto genético. Abreviaturas: Adj p-valor: valor p ajustado; CpG: sitios de citosina-fosfato-guanina; DMS: sitios de metilación diferencial; HC: piel sana de control; Log2FC: logaritmo del cambio de pliegue de los valores de metilación en muestras de psoriasis con respecto a los controles; L: piel lesional de la psoriasis; NL: piel no lesional de la psoriasis;

TSS200 Regiones promotoras 200 pb (pares de bases) aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción; 5'-UTR: región de 5'-untranslated; vs: versus.

## 8. Discusión

El eje de señalización TSP-1/CD47 ha sido considerado un importante sensor para mantener la homeostasis y regular las respuestas inmunes innatas y adaptativas [Safarti et al. 2008]. En este estudio hemos identificado un defecto en la expresión de CD47+ no sólo localmente en los linfocitos dérmicos, sino también en los linfocitos T CD4+ así como en las células dendríticas, tanto pDCs como mDCs de sangre periférica.

El impacto de la deficiencia de CD47+ en la inflamación de la piel se ha estudiado en modelos animales de reacciones de hipersensibilidad manifestadas como eccema de contacto. Una respuesta exacerbada de eccema de contacto por reacción de hipersensibilidad tipo IV, mediada por células T, que se asocia a inflamación prolongada, indica la importancia de la CD47 en diferentes fases de la respuesta inflamatoria [Lamy et al. 2007, Bouguermoth et al. 2008]. Además, se ha observado el mismo papel durante la resolución de la enfermedad en el eccema de contacto en ratones deficientes de TSP-1 [Lamy et al. 2007].

La TSP-1 está presente en cantidades bajas de manera basal en casi todos los tejidos, pero se incrementa rápida y transitoriamente bajo estrés o en tejidos dañados en respuesta a señales de inflamación [Raugi et al. 1987]. En la piel humana sana, la TSP-1 es producida por los queratinocitos de la capa basal epidérmica y se deposita en la zona de la membrana basal de la unión dermoepidérmica, contribuyendo mediante señales a evitar el crecimiento de vasos sanguíneos en la dermis. En esta

línea, la expresión de la TSP-1 está en general regulada a la baja en las enfermedades de la piel en las que se ha estudiado, como en los carcinomas primarios cutáneos de células escamosas [Stret et al. 1999] y en los queratinocitos de pacientes con psoriasis [Nickoloff et al. 1994]. Los linfocitos T, los macrófagos y las DCs pueden producir y expresar TSP-1 en superficie [Li et al. 2002, Marteau et al. 2005, Masli et al. 2002]. Nuestros resultados confirman que los niveles de TSP-1 están disminuidos en la piel de los pacientes de psoriasis en comparación con los controles. Encontramos diferencias en la expresión de la TSP-1 en células CD4<sup>+</sup> T periféricas o mDCs entre pacientes y controles, existiendo en los pacientes un defecto en su inducción en respuesta a LPS en las mDCs. Esto va en la misma línea del aumento del TSP-1 en las DCs activadas por el TLR frente a las DCs inmaduras observados por otros autores [Doyen et al. 2003]. Por lo tanto, la TSP-1 podría considerarse como un importante freno defectuoso en la psoriasis y esto podría estar mediado por su doble efecto, por un lado, cuando actúa impidiendo la angiogénesis y por otro, regulando la diferenciación de las células Th17 y Treg hacia un efecto antiinflamatorio. Como pruebas adicionales previas encontramos los resultados de los experimentos in vitro que han demostrado con anterioridad que añadir exógenamente el péptido TSP-1 inhibe la secreción de IL-12 por los monocitos en respuesta a las células T dependientes de estímulos [Armant et al. 1999] y que la TSP-1 es un co-estimulador las células T a través de su interacción con la integrina alfa4beta1 [Li et al. 2002].

Nuestros datos demuestran que la interacción TSP-1-CD47 o la incubación con anti-CD47 inhibe la diferenciación de las células Th17 y favorece la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> en células Treg de los pacientes con psoriasis. Se ha descrito que la administración tópica de un péptido TSP-1 de unión a CD47 durante el desarrollo de inflamación ocular atenúa los síntomas clínicos del ojo seco asociado al síndrome de Sjögren y aumenta la expresión del FoxP3 [Contreras Ruiz et al. 2018]. Esto concuerda con los resultados anteriores que sugieren que la activación del TGF-beta mediada por la TSP-1, así como su unión a CD47, puede crear un ambiente

antiinflamatorio en ciertos sitios de privilegio inmunológico como el ojo [Strelein et al. 2002]. Está bien establecido que la interacción de CD47 con SIRP  $\alpha$  regula negativamente la presentación del antígeno [Latour et al. 2001]. El anti-CD47 (clon B6H12.2) utilizado en nuestros ensayos funcionales, se ha descrito que imita la unión de la TSP-1 pero que también bloquea la unión de CD47 con SIRP  $\alpha$ . No podemos descartar que el bloqueo de la interacción CD47/SIRP  $\alpha$  esté implicado en los efectos observados con anti-CD47. Sin embargo, de acuerdo con los datos publicados anteriormente, este bloqueo conduciría a una mayor activación de las células T en lugar de la inhibición detectada en nuestros ensayos [Baba et al. 2013, Latour et al. 2001, Sun et al. 2016]. En el caso de los efectos de la TSP-1 exógena, es difícil reproducir la concentración fisiológica en ese contexto particular. Sin embargo, los ensayos de silenciamiento de la TSP-1 muestran claramente que la TSP-1 expresada por las DCs actúa como un regulador negativo de la respuesta inmunológica.

GADD45a ejerce sus funciones por medio de interacciones proteína-proteína en el núcleo y el citoplasma y es capaz de regular la proliferación celular, la supervivencia celular y la muerte celular entre otros procesos biológicos. Se han asociado señales específicas a la transcripción de genes de GADD45a. Así, GADD45a es un gen diana del p53 y, en lo que respecta al sistema inmunitario innato, las células dendríticas de ratones con deficiencia de GADD45a muestran una menor producción de citoquinas Th1 IL-12 e IFN- $\gamma$  y una expresión reducida de moléculas co-estimuladoras como CD40, de importancia capital en la sinapsis inmunológica [Liu et al., 2016].

En esta línea, las proteínas de la familia GADD45 se han vinculado a enfermedades en las que el sistema inmunológico desempeña un papel fundamental, entre ellas las enfermedades autoinmunes. Se ha descrito que los ratones con deficiencia de GADD45a desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la presencia de auto-anticuerpos contra el ADN de doble cadena similares a los encontrados en lupus eritematoso sistémico [Salvador et al., 2002].

De acuerdo a lo descrito en la parte introductoria de esta tesis doctoral, el GADD45a podría tener una relevancia aún indefinida en la psoriasis a través de su relación con: p38, su función regulatoria en sistema inmune innato (DCs e IFN-g) y su relación con los queratinocitos epidérmicos.

A diferencia de los datos previos de partida de nuestro grupo de investigación en cuanto a la sobreexpresión de GADD45a en queratinocitos mediada tras la estimulación con UV [de la Fuente et al., 2009], en este trabajo nos hemos encontrado que la expresión de esta proteína es bastante heterogénea y compleja, variable según cada tipo celular. Lo que nos hace pensar que su función pro o antiinflamatoria no se correlaciona tanto con sus niveles de expresión absolutos si no que su función varía de acuerdo al tipo celular.

Por un lado, respecto a la hipótesis de partida de que el GADD45a pueda participar en la activación de linfocitos T mediante la activación de p38, nuestros resultados lo descartan porque no encontramos diferencias en la activación de p38 tanto a nivel basal como tras la estimulación celular.

Respecto a su relación con la inmunidad innata, la expresión del GADD45a se correlaciona linealmente con el IFN-gamma en la piel lesional de los pacientes con psoriasis mediante una correlación positiva directa lo cual nos plantea la posibilidad de que los niveles elevados de ambas proteínas sean desencadenados por el mismo estímulo inflamatorio principal.

Por otra parte, la expresión del GADD45 se ha asociado con la reparación del ADN en los queratinocitos [Ellet et al., 1997]. Una vez más, nosotros, y otros grupos, hemos descrito la inducción de la expresión del GADD45 por la luz ultravioleta en los queratinocitos humanos [De la Fuente et al., 2009, Wan et al., 2000]. Esta inducción se ha vinculado a la producción de especies reactivas de oxígeno y a la activación de



la NADPH oxidasa, lo cual puede ser un mecanismo para contrarrestar el daño oxidativo. En este sentido, el GADD45a desempeña un papel en el punto de control del ciclo celular G2/M en las células irradiadas por UV. Los ratones transgénicos con deficiencia de GADD45a muestran inestabilidad genómica [Maeda et al., 2002]. Curiosamente, el GADD45a sirve de nexo entre la reparación del ADN y la regulación de los genes epigenéticos mediante la mediación de la desmetilación [Niehrs et al., 2012]. Se ha demostrado que el GADD45a se dirige al promotor del MMP-9 y recluta a la glicosilasa de ADN de timina (TDG) para inducir la demetilación del promotor del MMP-9 en los queratinocitos promoviendo su expresión [Zhou et al., 2017]. La anulación de GADD45a conduce a la hipermetilación de los promotores Dlx5 o Runx2 y a la supresión de la expresión de estos genes que afecta a la diferenciación osteogénica [Saletta et al., 2011]. La pérdida de GADD45a también redujo significativamente la expresión del UCHL1 a través de la metilación del promotor UCHL1 [Mitra et al., 2011].

La proteína GADD45a también ha estado implicada en numerosos procesos biológicos mediante el silenciamiento de genes por mecanismos epigenéticos, lo cual puede explicar sus efectos pleiotrópicos. La GADD45a interactúa con los complejos de reparación del ADN reclutándolos en sitios específicos y resultando en el reemplazo de la citosina metilada por otras no metiladas [Barreto et al., 2007, Cortelino et al., 2011, Schäfer et al., 2013, Schmitz et al., 2009, Khelifa Arab et al., 2014]

Esta última función de mecanismos de regulación epigenéticos es también de interés. A través de la función conocida como demetilasa, si que vemos que como GADD45a, disminuido en piel lesional psoriásica, no ejerce su función de demetilación y UCHL1 aparece hipermetilado.

La disminución de la expresión de GADD45a resulta en una hipermetilación del promotor de la UCHL1. La UCHL1, también conocida como PGP 9.5, es una enzima

con actividad de ligasa e hidrolasa que se expresa principalmente en las células neuroendocrinas y el sistema nervioso central. El UCHL1 determina los niveles celulares de ubiquitinas y glutatión y regula el ciclo celular. El UCHL1 aumenta la expresión de iNOS y suprime la actividad de NFkB inducida por el TNF- $\alpha$ , por otro lado, una citoquina clave en las fases iniciales de la inflamación en la psoriasis, lo cual podría ser una nueva prueba indirecta de la relación que esta molécula tiene en la patogenia de la enfermedad [Kubanov et al., 2015]. Por otro lado, el UCHL1, junto con la anfiregulina y la semaforina 3A, han sido descritas como moléculas sobreexpresadas en pacientes con psoriasis y dermatitis atópica y asociadas directamente con la transmisión de la pruricepción en las fibras C amielínicas sensitiva, lo cual podría justificar que en pacientes con sobreexpresión por hipermetilación de UCHL1 secundaria a infraexpresión de GADD45a hubiera un aumento de picor en las lesiones de psoriasis [Emtestam et al., 2012, Kupczyk et al., 2018].

Corroborando estas relaciones, la expresión de UCHL1 en los queratinocitos inhibe la secreción de IL-8, IFN $\gamma$  y MIP3 y su expresión también se ha asociado a la supresión de la iNOS inducida por el TNF $\alpha$  y la activación del NFk [Matuszczak et al., 2020]

Teniendo en cuenta todos estos datos, es factible plantear la hipótesis de que la proteína GADD45a podría tener un papel durante el desarrollo de la psoriasis, una enfermedad en la que la interacción de los queratinocitos y las células inmunes es fundamental y en la que las modificaciones epigenéticas causan aumentos aberrantes del grosor epidérmico, la diferenciación de los queratinocitos, la proliferación y la inflamación [Möbus et al., 2020].

## 9. Conclusiones

1. Las muestras de piel de pacientes con psoriasis expresan niveles más bajos de TSP-1, y CD47 en comparación con los controles sanos.
2. Las células T CD4+ y las células dendríticas periféricas de los pacientes con psoriasis expresan niveles más bajos de CD47 en comparación con los controles sanos.
3. La TSP-1 favorece la diferenciación células Treg (CD25+ FoxP3+) en pacientes con psoriasis.
4. La disminución de TSP-1 en CD4+ y células dendríticas mieloides favorece la activación de células T.
5. Los queratinocitos de piel lesional de pacientes con psoriasis expresan bajos niveles de GADD45a en comparación con la piel no lesional o la piel de controles sanos.
6. La expresión de GADD45a se correlaciona con los niveles de IFN-gamma en la piel lesional de los pacientes con psoriasis.
7. Las células T CD4+ de sangre periférica de la psoriasis expresan niveles altos de GADD45a.
8. No hay diferencias en la activación de la p38 en las células T CD4+ de los pacientes con psoriasis en comparación con los controles sanos.
9. Las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos expresan niveles bajos de GADD45a en pacientes con psoriasis.
10. La piel lesional de los pacientes con psoriasis expresa niveles bajos de UCHL1 que se correlacionan con los niveles de GADD45a.

## 10. Bibliografía

1. Agah AKT, Lawler J, Bornstein P. The lack of thrombospondin-1 (TSP-1) dictates the course of wound healing in double-TSP-1/TSP2-null mice. *Am J Pathol.* 2002 Sep; 161:831–9.
2. Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, et al. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115:81.
3. Allen MH, Ameen H, Veal C, et al. The major psoriasis susceptibility locus PSORS1 is not a risk factor for late-onset psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2005;124:103-106.
4. Alunno A, Carubbi F, Cafaro G, et al. Targeting the IL-23/IL-17 axis for the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Expert Opin Biol Ther* 2015; 15:1727.
5. Arakawa A, Siewert K, Stöhr J, et al. Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *J Exp Med* 2015; 212:2203.
6. Armant M, Avic MN, Hermann P, Rubio M, Kiniwa M, Delespesse G, et al. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. *J Exp Med.* 1999; 190:1175–82.
7. Baba N, Van VQ, Wakahara K, Rubio M, Fortin G, Panzini B, et al. CD47 fusion protein targets CD172a+ cells in Crohn's disease and dampens the production of IL-1beta and TNF. *J Exp Med.* 2013; 210:1251–63.
8. Baenziger, N.L., Brodie, G.N., Majerus, P.W., 1971. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 240–243.
9. Blauvelt A, Papp KA, Griffiths CE, et al. Efficacy and safety of guselkumab, an anti-interleukin-23 monoclonal antibody, compared with adalimumab for the continuous treatment of patients with moderate to severe psoriasis: Results from the phase III, double-blinded, placebo- and active comparator-controlled VOYAGE 1 trial. *J Am Acad Dermatol* 2017; 76:405.
10. Blauvelt A, Reich K, Lebwohl M, et al. Certolizumab pegol for the treatment of patients with moderate-to-severe chronic plaque psoriasis: pooled analysis of

- week 16 data from three randomized controlled trials. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019; 33:546.
11. Blauvelt A. T-helper 17 cells in psoriatic plaques and additional genetic links between IL-23 and psoriasis. *J Invest Dermatol* 2008; 128:1064.
  12. Blumberg H, Conklin D, Xu WF, et al. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 2001; 104:9.
  13. Boehncke WH, Wortmann S, Kaufmann R, et al. A subset of macrophages located along the basement membrane ("lining cells") is a characteristic histopathological feature of psoriasis. *Am J Dermatopathol* 1995; 17:139.
  14. Bongrazio M, Da Silva-Azevedo L, Bergmann EC, et al. Shear stress modulates the expression of thrombospondin-1 and CD36 in endothelial cells in vitro and during shear stress-induced angiogenesis in vivo. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006;19: 35–48.
  15. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, et al. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005; 174:3695.
  16. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, et al. Immunocompetent cells in psoriasis. In situ immunophenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res* 1983; 275:181.
  17. Bouguermouh S, Van VQ, Martel J, Gautier P, Rubio M, Sarfati M. CD47 expression on T cell is a self-control negative regulator of type 1 immune response. *J Immunol*. 2008; 180:8073–82.
  18. Bowcock A, Shannon L, et al. Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum Mol Genet*. 2001. 10: 1793-805.
  19. Braun-Falco O, Burg G. Inflammatory infiltrate in psoriasis vulgaris. A cytochemical study. *Arch Klin Exp Dermatol* 1970; 236:297.
  20. Broome AM, Ryan D, Eckert RL. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem* 2003;51:675–85.

21. Bujak R, Struck-Lewicka W, Markuszewski MJ, Kaliszan R. Metabolomics for laboratory diagnostics. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 113:108–20.
22. C, Krueger JG. Expanding the psoriasis disease profile: interrogation of the skin and serum of patients with moderate-to severe psoriasis. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 2552–64.
23. Capon F, Bijlmakers M-J, Wolf N, Quaranta M, Huffmeier U, Allen M, et al. Identification of ZNF313/RNF114 as a novel psoriasis susceptibility gene. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 1938–45.
24. Capon F, Di Meglio P, Szaub J, Prescott NJ, Dunster C, Baumber L, et al. Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet* 2007; 122:201–6.
25. Carleen LM, Sanchez F, Bergman AC, Becker S, Hirschberg D, Franzen B, et al. Proteome analysis of skin distinguishes acute guttate from chronic plaque psoriasis. *J Invest Dermatol* 2004; 124:63–9.
26. Chamian F, Lowes MA, Lin SL, et al. Alefacept reduces infiltrating T cells, activated dendritic cells, and inflammatory genes in psoriasis vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:2075.
27. Chamian F, Krueger JG. Psoriasis vulgaris: an interplay of T lymphocytes, dendritic cells, and inflammatory cytokines in pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* 2004 16: 331-7.
28. Chan JR, Blumenschein W, Murphy E, et al. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med* 2006; 203:2577.
29. Chatzikyriakidou AP, Voulgari V, et al. The role of microRNA-146a (miR-146a) and its target IL-1R-associated kinase (IRAK1) in psoriatic arthritis susceptibility. *Scand J Immunol.* 2010. 71: 382-5.
30. Cheuk S, Wikén M, Blomqvist L, et al. Epidermal Th22 and Tc17 cells form a localized disease memory in clinically healed psoriasis. *J Immunol* 2014; 192:3111.

31. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF- $\alpha$  in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2011; 131:677.
32. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154:3–20.
33. Conrad C, Boyman O, Tonel G, et al. Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat Med* 2007; 13:836.
34. Contreras Ruiz L, Mir FA, Turpie B, Masli S. Thrombospondin-derived peptide attenuates Sjogren's syndrome-associated ocular surface inflammation in mice. *Clin Exp Immunol*. 2017; 188:86–95.
35. Cools, N., et al., Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol*, 2007. 82: 1365-74.
36. Costa C, Incio J, Soares R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 2007; 10:149.
37. DaErme AM, Wilsmann-Theis D, Wagenpfeil J, Hoan-Izel M, Ferring-Schmitt S, Sternberg S, et al. IL-36c (IL-1F9) is a biomarker for psoriasis skin lesions. *J Invest Dermatol* 2015; 135:1025–32.
38. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*. 1994; 265: 1582–1584.
39. Daniel C, Schaub K, Amann K, Lawler J, Hugo C. Thrombospondin-1 is an endogenous activator of TGF-beta in experimental diabetic nephropathy in vivo. *Diabetes* 2007; 56:2982–9.
40. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 1997; 138:707–17.

41. de la Fuente H, Cibrián D, Sánchez-Madrid F. Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response. *FEBS Lett.* 2012;586:2897–2905.
42. de la Fuente H, Lamana A, Mittelbrunn M, et al. Identification of genes responsive to solar simulated UV radiation in human monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One.* 2009;4:e6735. Published 2009 Aug 26.
43. Deeks ED. Apremilast: a review in psoriasis and psoriatic arthritis. *Drugs.* 2015. 75: 1393-403.
44. Detmar M, Brown LF, Claffey KP, et al. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med.* 1994; 180:1141.
45. Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2009; 129:1339.
46. DiPietro LA, Polverin PJ. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. *Am J Pathol.* 1993; 143: 678–684.
47. Doyen V, Rubio M, Braun D, Nakajima T, Abe J, Saito H, et al. Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J Exp Med.* 2003; 198:1277–83.
48. Doyen, V., et al., Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J Exp Med*, 2003. 198: p. 1277-83.
49. Dragon S, Saffar AS, Shan L, Gounni AS. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol* 2008; 45:160.
50. Du C, Liu C, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol.* 2009; 10: 1252-9.
51. Duculan J, Coats I, et al. Combined use of laser capture microdissection and cDNA microarray analysis identifies locally expressed disease-related genes in focal regions of psoriasis vulgaris skin lesions. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 1615–26.
52. Ehrlich A, Booher S, Becerra Y, et al. Micellar paclitaxel improves severe psoriasis in a prospective phase II pilot study. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50:533.



53. Eller MS, Maeda T, Magnoni C, Atwal D, Gilchrest BA. Mejora de la reparación del ADN en células de la piel humana por dinucleótidos de timidina: evidencia de una respuesta SOS de mamíferos mediada por p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 12627-12632.
54. Ellis CN, Gorsulowsky DC, Hamilton TA, et al. Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. *JAMA* 1986; 256:3110.
55. Emtestam L, Hagströmer L, Dou YC, Sartorius K, Johansson O. PGP 9.5 distribution patterns in biopsies from early lesions of atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*. 2012;304: 781-785.
56. Fan X, Yang S, Huang W, Wang ZM, Sun LD, Liang Y-H, et al. Fine mapping of the psoriasis susceptibility locus PSORS1 supports HLA-C as the susceptibility gene in the Han Chinese population. *PLoS Genet* 2008; 4: e1000038.
57. Farkas A, Kemény L. Interferon- $\alpha$  in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology. *Br J Dermatol* 2011; 165:247.
58. Flisiak I, Chodyncka B, Porebski P, Flisiak R. Association between psoriasis severity and transforming growth factor beta(1) and beta (2) in plasma and scales from psoriatic lesions. *Cytokine*. 2002;19(3):121–125.
59. Funk J, Langeland T, Schrumpf E, Hanssen LE. Psoriasis induced by interferon-alpha. *Br J Dermatol* 1991; 125:463.
60. Gallais Sérézal I, Classon C, Cheuk S, et al. Resident T Cells in Resolved Psoriasis Steer Tissue Responses that Stratify Clinical Outcome. *J Invest Dermatol* 2018; 138:1754.
61. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, et al. Self-RNA-ntimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med*. 2009;206:1983–1994.
62. Garbaraviciene J, Diehl S, Varwig D, Bylaite M, Ackermann H, Ludwig RJ, et al. Platelet P-selectin reflects a state of cutaneous inflammation: possible application to monitor treatment efficacy in psoriasis. *Exp Dermatol* 2010;19:736–41.

63. Gaspari AA. Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54:S67.
64. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Lyakh LA, et al. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J Exp Med.* 2008; 205:1447.
65. Glowacka E, Lewkowicz P, Rotsztejn H, Zalewska A. IL-8, IL-12 and IL-10 cytokines generation by neutrophils, fibroblasts and neutrophils- fibroblasts interaction in psoriasis. *Adv Med Sci.* 2010; 55:254.
66. Gordon KB, Blauvelt A, Papp KA, et al. Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med.* 2016; 375:345.
67. Gottlieb AB, Lebwohl M, Shirin S, et al. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: results of a pilot, multicenter, multiple-dose, placebo-controlled study. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 43:595.
68. Grimbort P, Bouguermouh S, Baba N, Nakajima T, Allakhverdi Z, Braun D, et al. Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T cells in response to inflammation. *J Immunol.* 2006; 177:3534–41.
69. Gu X, Nylander E, et al. Effect of narrow-band ultraviolet B phototherapy on p63 and microRNA (miR-21 and miR-125b) expression in psoriatic epidermis." *Acta Derm Venereol.* 2011; 91: 392-7.
70. Gudjonsson JE, Ding J, Johnston A, Tejasvi T, Guzman AM, Nair RP, et al. Assessment of the psoriatic transcriptome in a large sample: additional regulated genes and comparisons with in vitro models. *J Invest Dermatol* 2010;130:1829–40.
71. Gudjonsson JE, Ding J, Li X, Nair RP, Tejasvi T, Qin ZS, et al. Global gene expression analysis reveals evidence for decreased lipid biosynthesis and increased innate immunity in uninvolved psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 2009;129:2795–804.
72. Gudjonsson JE, Ding J, et al. Assessment of the psoriatic transcriptome in a large sample: additional regulated genes and comparisons with in vitro models. *J Invest Dermatol.* 2010; 130: 1829-40.

73. Guillailliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Donna N, Schraml BU et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol* 2014; 14:571–8.
74. Haider AS, Cohen J, Fei J, et al. Insights into gene modulation by therapeutic TNF and IFNgamma antibodies: TNF regulates IFNgamma production by T cells and TNF-regulated genes linked to psoriasis transcriptome. *J Invest Dermatol.* 2008; 128:655
75. Haider AS, Lowes MA, Suárez-Fariñas M, et al. Identification of cellular pathways of "type 1," Th17 T cells, and TNF- and inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of cyclosporine A in psoriasis. *J Immunol* 2008; 180:1913.
76. Hänsel A, Günther C, Ingwersen J, et al. Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:787.
77. Harper EG, Guo C, Rizzo H, et al. Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2009; 129:2175.
78. Hida S, Ogasawara K, Sato K, et al. CD8(+) T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon-alpha/beta signaling. *Immunity* 2000; 13:643.
79. Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 2006; 177:7980.
80. Higgins SC, Jarnicki AG, Lavelle EC, Mills KH. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 2006; 177:7980.
81. Hollox EJ, Huffmeier U, Zeeuwen PL, et al. Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet* 2008; 40:23.

82. Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 2000; 164:6621.
83. Honigsmann, H., Phototherapy for psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, 2001. 26: p. 343-50.
84. Huanffmeier U, Uebe S, Ekici AB, Bowes J, Giardina E, Korendowych E, et al. Common variants at TRAF3IP2 are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis. *Nat Genet* 2010;42:996–9.
85. Ichihara A, Jinnin M, Oyama R, Yamane K, Fujisawa A, Sakai K, et al. Increased serum levels of miR-1266 in patients with psoriasis vulgaris. *Eur J Dermatol* 2012;22:68–71.
86. Ichihara A, Jinnin M, Yamane K, et al. microRNA-mediated keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol*. 2011;165:1003-1010.
87. Isenberg, J.S., Annis, D.S., Pendrak, M.L., Ptaszynska, M., Frazier, W.A., Mosher, D.F., Roberts, D.D., 2009a. Differential interactions of thrombospondin-1, -2, and-4 with CD47 and effects on cGMP signaling and ischemic injury responses. *J. Biol. Chem.* 284, 1116–1125.
88. Isenberg J, Wink DA, Roberts D. Thrombospondin-1 antagonizes nitric oxide-stimulated vascular smooth muscle cell responses. *Cardiovasc Res.* 2006; 71: 785–793.
89. J, et al. Metabolomics in psoriatic disease: pilot study reveals metabolite differences in psoriasis and psoriatic arthritis. *F1000Res* 2014; 3:248–62.
90. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, et al. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010; 130:1373.
91. Kauffman, C.L., et al., A phase I study evaluating the safety, pharmacokinetics, and clinical response of a human IL-12 p40 antibody in subjects with plaque psoriasis. *J Invest Dermatol*, 2004. 123: p. 1037-44.
92. Ketikoglou I, Karatapanis S, Elefsiniotis I, et al. Extensive psoriasis induced by pegylated interferon alpha-2b treatment for chronic hepatitis B. *Eur J Dermatol* 2005; 15:107.

93. Krishna SM, Golledge J. The role of thrombospondin-1 in cardiovascular health and pathology. *Int J Cardiol.* 2013; 168:692–706.
94. Krueger GG, Langley RG, Leonardi C, et al. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med* 2007; 356:580.
95. Krueger GG, Papp KA, Stough DB, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study evaluating efficacy and tolerability of 2 courses of alefacept in patients with chronic plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47:821.
96. Krueger GG. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med.* 2007; 356: p. 580-92.
97. Kubanov AA, Katunina OR, Chikin VV. Expression of Neuropeptides, Neurotrophins, and Neurotransmitters in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Bull Exp Biol Med.* 2015;159:318-322.
98. Kulig P, Musiol S, Freiburger SN, et al. IL-12 protects from psoriasiform skin inflammation. *Nat Commun* 2016; 7:13466.
99. Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol.* 2011;8:706-713.
100. Kupczyk P, Reich A, Gajda M, et al. UCHL1/PGP 9.5 Dynamic in Neuro-Immune-Cutaneous Milieu: Focusing on Axonal Nerve Terminals and Epidermal Keratinocytes in Psoriatic Itch. *Biomed Res Int.* 2018;2018:7489316.
101. Kurzeja M, Rudnicka L, Olszewska M. New interleukin-23 pathway inhibitors in dermatology: ustekinumab, briakinumab, and secukinumab. *Am J Clin Dermatol* 2011; 12:113.
102. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 1999; 162:2347.
103. Lamy L, Foussat A, Brown EJ, Bornstein P, Ticchioni M, Bernard A. Interactions between CD47 and thrombospondin reduce inflammation. *J Immunol.* 2007; 178:5930–9.

104. Lande R, Botti E, Jandus C, et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nat Commun* 2014; 5:5621.
105. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007; 449:564.
106. Lande, R., et al., Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 2007. 449(7162): p. 564-9.
107. Langley RG, Elewski BE, Lebwohl M, et al. Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. *N Engl J Med* 2014; 371:326.
108. Latour S, Tanaka H, Demeure C, Mateo V, Rubio M, Brown EJ, et al. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein- $\alpha$ : down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol*. 2001; 167:2547–54.
109. Lawler, J., 2000. The functions of thrombospondin-1 and -2. *Curr. Opin. Cell Biol*. 12, 634–640.
110. Laws P, Young H. Current and emerging systemic treatment strategies for psoriasis. *Drugs*. 2012; 72: 1867-80.
111. Lebwohl M, Strober B, Menter A, et al. Phase 3 Studies Comparing Brodalumab with Ustekinumab in Psoriasis. *N Engl J Med*. 2015; 373:1318.
112. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med*. 2004; 199:125.
113. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med*. 2004; 199:125.
114. Lee T, Esemuede N, Sumpio BE, Gahtan V. Thrombospondin-1 induces matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 2003;38:147–54.
115. Lee E. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med*. 2004; 199: p. 125-30.

116. Levendord MB, Zibert JR, Gyldenl.ve M, R.pke MA, Skov L. MicroRNA-223 and miR-143 are important systemic biomarkers for disease activity in psoriasis. *J Dermatol Sci* 2014;75:133–9.
117. Li SS, Ivanoff A, Bergstrom SE, Sandstrom A, Christensson B, van Nerven J, et al. T lymphocyte expression of thrombospondin-1 and adhesion to extracellular matrix components. *Eur J Immunol.* 2002; 32:1069–79.
118. Li Z, Calzada MJ, Sipes JM, Cashel JA, Kruttsch HC, Annis DS, et al. Interactions of thrombospondins with alpha4beta1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J Cell Biol.* 2002; 157:509–19.
119. Li, Z., et al., Interactions of thrombospondins with alpha4beta1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J Cell Biol*, 2002. 157: p. 509-19.
120. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203:2271.
121. Liang Y, Pan HF, Ye DQ. IL-17A-producing CD8(+) T cells as therapeutic targets in autoimmunity. *Expert Opin Ther Targets.* 2015; 19:651.
122. Lin WJ, Norris DA, Achziger M, et al. Oligoclonal expansion of intraepidermal T cells in psoriasis skin lesions. *J Invest Dermatol* 2001; 117:1546.
123. Liu L, Tran E, Zhao Y, Huang Y, Flavell R, Lu B. GADD45 beta and GADD45 gamma are critical for regulating autoimmunity [published correction appears in *J Exp Med.* 2006 Jan 23;203(1):253]. *J Exp Med.* 2005;202:1341-1347.
124. Liu Y, Helms C, Liao W, et al. A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet* 2008; 4:e1000041.
125. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 2007; 445:866.
126. Lowes MA, Chamian F, Abello MV, et al. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:19057.

127. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol* 2008; 128:1207.
128. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:227–255.
129. Lowes, M.A., et al., Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102: p. 19057-62.
130. Lu, B., A.F. Ferrandino, and R.A. Flavell, GADD45beta is important for perpetuating cognate and inflammatory signals in T cells. *Nat Immunol*, 2004. 5: p. 38-44.
131. Lu, B., et al., GADD45gamma mediates the activation of the p38 and JNK MAP kinase pathways and cytokine production in effector TH1 cells. *Immunity*, 2001. 14: p. 583-90.
132. Lundberg KC, Fritz Y, Johnston A, Foster AM, Baliwag J, Gudjonsson JE, et al. Proteomics of skin proteins in psoriasis: from discovery and verification in a mouse model to confirmation in humans. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 109–19.
133. Maeda T, Hanna AN, Sim AB, Chua PP, Chong MT, Tron VA. GADD45 regula el arresto de G2/M, la reparación del ADN y la muerte celular en los queratinocitos tras la exposición a los rayos ultravioleta. *J Invest Dermatol*. 2002;119:22-26.
134. Makino K, Jinnin M, et al. Circulating miR-142-3p levels in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Dermatol*. 2012; 31: 34-9.
135. Mansfield PJ, Suchard SJ. Thrombospondin promotes chemotaxis and haptotaxis of human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1994; 153:4219–29.
136. Markham A. Ixekizumab: first global approval. *Drugs*. 2016; 76: 901-5.
137. Marteau F, Gonzalez NS, Communi D, Goldman M, Boeynaems JM, Communi D. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. *Blood*. 2005; 106:3860– 6.



138. Martin-Manso G, Galli S, Ridnour LA, Tsokos M, Wink DA, Roberts DD. Thrombospondin-1 promotes tumor macrophage recruitment and enhances tumor cell cytotoxicity of differentiated U937 cells. *Cancer Res* 2008;68:7090–9.
139. Martin D, Towne J, et al. The emerging role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis: preclinical and clinical findings. *J Invest Dermatol.* 2013. 133: 17-26.
140. Martini E, Wikén M, Cheuk S, et al. Dynamic Changes in Resident and Infiltrating Epidermal Dendritic Cells in Active and Resolved Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2017; 137:865.
141. Masli S, Turpie B, Hecker KH, Streilein JW. Expression of thrombospondin in TGFbeta-treated APCs and its relevance to their immune deviation-promoting properties. *J Immunol.* 2002; 168:2264–73.
142. Masli S, Turpie B, Streilein JW. Thrombospondin orchestrates the tolerance-promoting properties of TGFbeta-treated antigen-presenting cells. *Int Immunol* 2006;18:689–99.
143. Matuszczak E, Tylicka M, Komarowska MD, Debek W, Hermanowicz A. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 - physiology and pathology [published online ahead of print, 2020 Mar 24]. *Cell Biochem Funct.* 2020;10.1002/cbf.3527.
144. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 2006; 27:17.
145. Menter A, Tying SK, GordoChan JR, Blumenschein W, Murphy E, et al. IL-23 stimulates epidermal hyperplasia via TNF and IL-20R2-dependent mechanisms with implications for psoriasis pathogenesis. *J Exp Med* 2006; 203:2577.
146. Menter A, Tying SK, Gordon K, et al. Adalimumab therapy for moderate to severe psoriasis: A randomized, controlled phase III trial. *J Am Acad Dermatol* 2008; 58:106.
147. Mitra S, Sammani S, Wang T, et al. Role of growth arrest and DNA damage-inducible  $\alpha$  in Akt phosphorylation and ubiquitination after mechanical stress-induced vascular injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(9):1030-1040.
148. Mitsui H, Suárez-Fariñas M, Belkin DA, et al. Combined use of laser capture microdissection and cDNA microarray analysis identifies locally expressed

- disease-related genes in focal regions of psoriasis vulgaris skin lesions. *J Invest Dermatol*. 2012;132:1615-1626.
149. Mittelbrunn, M., et al., Solar-simulated ultraviolet radiation induces abnormal maturation and defective chemotaxis of dendritic cells. *J Invest Dermatol*, 2005. 125: p. 334-42.
  150. Möbus L, Weidinger S, Emmert H. Epigenetic factors involved in the pathophysiology of inflammatory skin diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145:1049-1060.
  151. Nair RP, Stuart P, Henseler T, Jenisch S, Chia NV, Westphal E, et al. Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am J Hum Genet* 2000;66: 1833–44.
  152. Nesselroth SM, Willis AI, Fuse S, et al. The C-terminal domain of thrombospondin-1 induces vascular smooth muscle cell chemotaxis. *J Vasc*
  153. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 2005; 202:135.
  154. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med* 2009; 361:496.
  155. Nestle, F.O., et al., Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*, 2005. 202: p. 135-43.
  156. Nesselroth SM, Willis AI, Fuse S, et al. The C-terminal domain of thrombospondin-1 induces vascular smooth muscle cell chemotaxis. *J Vasc Surg*. 2001;33:595-600.
  157. Nickoloff BJ, Mitra RS, Varani J, Dixit VM, Poverini PJ. Aberrant production of interleukin-8 and thrombospondin-1 by psoriatic keratinocytes mediates angiogenesis. *Am J Pathol*. 1994; 144:820–8.
  158. Nickoloff BJ, Wrono-Smith T. Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol*. 1999; 155:145.
  159. Niehrs C, Schäfer A. Active DNA demethylation by GADD45 and DNA repair. *Trends Cell Biol*. 2012;22:220–227.
  160. Nikaein A, Phillips C, Gilbert SC, et al. Characterization of skin-infiltrating lymphocytes in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 1991; 96:3.

161. Nograles KE, Krueger JG. Anti-cytokine therapies for psoriasis. *Exp Cell Res* 2011; 317:1293.
162. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 2003; 101:2620.
163. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:295-312.
164. Oestreicher J, Walters I, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Surette J, Schwertschlag U, et al. Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. *Pharmacogenomics J* 2001;1:272–87.
165. Olazabal I. Activation Outcomes Induced in Naive CD8 T-Cells by Macrophages Primed via "Phagocytic" and Nonphagocytic Pathways. *Mol Biol Cell*. 2008; 19: p. 701-10.
166. Ortega C, Fernández-A S, Carrillo JM, et al. IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol* 2009; 86:435.
167. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A. and Hymowitz, S.G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol*. 2011. 29, 71–109.
168. Papp K, Thaçi D, Reich K, et al. Tildrakizumab (MK-3222), an anti-interleukin-23p19 monoclonal antibody, improves psoriasis in a phase IIb randomized placebo-controlled trial. *Br J Dermatol* 2015; 173:930.
169. Papp KA, Blauvelt A, Bukhalo M, et al. Risankizumab versus Ustekinumab for Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med* 2017; 376:1551.
170. Papp KA, Kaufmann R, Thaçi D, et al. Efficacy and safety of apremilast in subjects with moderate to severe plaque psoriasis: results from a phase II, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, dose-comparison study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27:e376.
171. Papp KA, Menter MA, Raman M, et al. A randomized phase 2b trial of baricitinib, an oral Janus kinase (JAK) 1/JAK2 inhibitor, in patients with moderate-to-severe psoriasis. *Br J Dermatol* 2016; 174:1266.

172. Papp KA, Merola JF, Gottlieb AB, et al. Dual neutralization of both interleukin 17A and interleukin 17F with bimekizumab in patients with psoriasis: Results from BE ABLE 1, a 12-week randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 2b trial. *J Am Acad Dermatol* 2018; 79:277.
173. Papp KA, Tying S, Lahfa M, et al. A global phase III randomized controlled trial of etanercept in psoriasis: safety, efficacy, and effect of dose reduction. *Br J Dermatol* 2005; 152:1304.
174. Patel U, Mark NM, Machler BC, Levine VJ. Imiquimod 5% cream induced psoriasis: a case report, summary of the literature and mechanism. *Br J Dermatol* 2011; 164:670.
175. Pedrosa E, Carretero-Iglesia L, Boada A, et al. CCL4L polymorphisms and CCL4/CCL4L serum levels are associated with psoriasis severity. *J Invest Dermatol*. 2011;131:1830-1837.
176. Peng H, Kaplan N, Hamanaka RB, et al. microRNA-31/factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1 nexus regulates keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(35):14030-14034.
177. Perera G, Di Meglio P, et al. Psoriasis. *Annu Rev Pathol*. 2013; 7: 385-422.
178. Phelan MW, Forman LW, Perrine SP, Faller DV. Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med*. 1998; 132:519-529.
179. Piruzian E, Bruskin S, Ishkin A, Abdeev R, Moshkovskii S, Melnik S, et al. Integrated network analysis of transcriptomic and proteomic data in psoriasis. *BMC Syst Biol* 2010;4:41.
180. Piskin G, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Teunissen MB. In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin. *J Immunol*. 2006; 176:1908.
181. Piskin G, Tursen U, Sylva-Steenland RM, et al. Clinical improvement in chronic plaque-type psoriasis lesions after narrow-band UVB therapy is accompanied by a decrease in the expression of IFN-gamma inducers -- IL-12, IL-18 and IL-23. *Exp Dermatol*. 2004; 13:764.

182. Piskin G, Tursen U, Sylva-Steenland RM, et al. Clinical improvement in chronic plaque-type psoriasis lesions after narrow-band UVB therapy is accompanied by a decrease in the expression of IFN-gamma inducers -- IL-12, IL-18 and IL-23. *Exp Dermatol* 2004; 13:764.
183. Pivarcsi A, Meisgen F, Xu N, Stähle M, Sonkoly E. Changes in the level of serum microRNAs in patients with psoriasis after antitumour necrosis factor- $\alpha$  therapy. *Br J Dermatol*. 2013;169:563-570.
184. Prinz JC, Vollmer S, Boehncke WH, et al. Selection of conserved TCR VDJ rearrangements in chronic psoriatic plaques indicates a common antigen in psoriasis vulgaris. *Eur J Immunol* 1999; 29:3360.
185. Puig L, Julia A, Marsal S. The pathogenesis and genetics of psoriasis. *Actas Dermosifiliogr* 2014;105:535–45.
186. Rácz E, Prens EP, Kurek D, et al. Effective treatment of psoriasis with narrow-band UVB phototherapy is linked to suppression of the IFN and Th17 pathways. *J Invest Dermatol*. 2011; 131:1547.
187. Raugi GJ, Olerud JE, Gown AM. Thrombospondin in early human wound tissue. *J Invest Dermatol*. 1987; 89:551–4.
188. Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem*. 2001; 276:37692.
189. Reich K, Nestle FO, Papp K, et al. Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: a phase III, multicentre, double-blind trial. *Lancet*. 2005; 366:1367.
190. Reich K, Papp KA, Matheson RT, et al. Evidence that a neutrophil-keratinocyte crosstalk is an early target of IL-17A inhibition in psoriasis. *Exp Dermatol* 2015; 24:529.
191. Reich K, Rich P, Maari C, et al. Efficacy and safety of mirikizumab (LY3074828) in the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: results from a randomized phase II study. *Br J Dermatol* 2019; 181:88.

192. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;80(2):193-208.
193. Rizzo HL, Kagami S, Phillips KG, et al. IL-23-mediated psoriasis-like epidermal hyperplasia is dependent on IL-17A. *J Immunol* 2011; 186:1495.
194. Roberson ED, Liu Y, Ryan C, Joyce CE, Duan S, Cao L, et al. A subset of methylated CpG sites differentiate psoriatic from normal skin. *J Invest Dermatol* 2012;132:583–92.
195. Roberts DD, Isenberg JS, Ridnour LA, Wink DA. Nitric oxide and its gatekeeper thrombospondin-1 in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2007;13:795–8.
196. Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Rebelo I, Figueiredo A, Quintanilha A, Teixeira F. The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *Br J Dermatol* 2004;150:917–28.
197. Rogers N, Sharifi-Sanjani M, Csányi G, Pagano P, Isenberg J. Thrombospondin-1 and CD47 regulation of cardiac, pulmonary and vascular responses in health and disease. *Matrix Biology*. 2014;37:92-101.
198. Rogers NM, Thomson AW, Isenberg JS. Activation of parenchymal CD47 promotes renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(9):1538-1550.
199. Roman M, Madkan VK, Chiu MW. Profile of secukinumab in the treatment of psoriasis: current perspectives. *Ther Clin Risk Manag*. 2015;11:1767-1777.
200. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:933.
201. Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem* 2004; 279:2559.
202. Saletta F, Suryo Rahmanto Y, Siafakas AR, Richardson DR. Cellular iron depletion and the mechanisms involved in the iron-dependent regulation of the growth arrest and DNA damage family of genes. *J Biol Chem*. 2011;286:35396-35406.

203. Salvador, J.M., et al., Mice lacking the p53-effector gene GADD45a develop a lupus-like syndrome. *Immunity*, 2002. 16: p. 499-508.
204. Sarfati M, Fortin G, Raymond M, Susin S. CD47 in the immune response: role of thrombospondin and SIRP-alpha reverse signaling. *Curr Drug Targets*. 2008; 9:842–50.
205. Sarfati, M., Fortin, G., Raymond, M., Susin, S., 2008. CD47 in the immune response: role of thrombospondin and SIRP-alpha reverse signaling. *Curr. Drug Targets* 9, 842–850.
206. Schöler N, Langer C, Döhner H, Buske C, Kuchenbauer F. Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. *Exp Hematol*. 2010;38:1126-1130.
207. Schonthaler HB, Guinea-Viniegra J, Wculek SK, Ruppen I, Ximenez-Embun P, Guio-Carrion A, et al. S100A8-S100A9 protein complex mediates psoriasis by regulating the expression of complement factor C3. *Immunity* 2013;39:1171–81.
208. Singh S, Pradhan D, Puri P, et al. Genomic alterations driving psoriasis pathogenesis. *Gene*. 2019;683:61-71.
209. Sitter B, Johnsson MK, Halgunset J, Bathen TF. Metabolic changes in psoriatic skin under topical corticosteroid treatment. *BMC Dermatol* 2013;13:1–7.
210. Sonkoly E, Wei T, Janson PC, et al. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?. *PLoS One*. 2007;2:e610.
211. Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J Immunol*. 2002; 169:642.
212. Stenderup K, Rosada C, Worsaae A, et al. Interleukin-20 plays a critical role in maintenance and development of psoriasis in the human xenograft transplantation model. *Br J Dermatol*. 2009; 160:284.
213. Stockenhuber K, Hegazy AN, West NR, et al. Foxp3+ T reg cells control psoriasiform inflammation by restraining an IFN-I-driven CD8+ T cell response. *J Exp Med* 2018; 215:1987.

214. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:281.
215. Streilein JW, Masli S, Takeuchi M, Kezuka T. The eye's view of antigen presentation. *Hum Immunol*. 2002; 63:435–43.
216. Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, et al. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol*. 1999; 155:441–52.
217. Suárez-Fariñas M, Li K, Fuentes-Duculan J, Hayden K, Brodmerkel C, Krueger JG. Expanding the psoriasis disease profile: interrogation of the skin and serum of patients with moderate-to-severe psoriasis [published correction appears in *J Invest Dermatol*. 2015 Nov;135: 2901-2]. *J Invest Dermatol*. 2012;132(11):2552-2564.
218. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005; 174:164.
219. Sun FJ, Zhang CQ, Chen X, Wei YJ, Li S, Liu SY, et al. Downregulation of CD47 and CD200 in patients with focal cortical dysplasia type IIb and tuberous sclerosis complex. *J Neuroinflamm*. 2016; 13:85.
220. Svensson CI, Inoue T, Hammaker D, y otros. Deficiencia de GADD45beta en la artritis reumatoide: aumento de la sinovitis mediante la señalización JNK. *Arthritis Rheum*. 2009;60:3229-3240.
221. Szabo SK, Hammerberg C, Yoshida Y, et al. Identification and quantitation of interferon-gamma producing T cells in psoriatic lesions: localization to both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subsets. *J Invest Dermatol* 1998; 111:1072.
222. Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 1990;111:765–72.
223. Teruel R, Pérez-Sánchez C, Corral J, et al. Identification of miRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus



- erythematosus and antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost.* 2011;9:1985-1992.
224. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008; 223:87.
  225. Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998; 111:645.
  226. Theoharides TC, Zhang B, Kempuraj D, Tagen M, Vasiadi M, Angelidou A, et al. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 4448–53.
  227. Tili E, Michaille JJ, Croce CM. MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunol Rev.* 2013;253:167-184.
  228. Toichi E, Torres G, McCormick TS, et al. An anti-IL-12p40 antibody down-regulates type 1 cytokines, chemokines, and IL-12/IL-23 in psoriasis. *J Immunol* 2006; 177:4917.
  229. Tonel G, Conrad C, Laggner U, et al. Cutting edge: A critical functional role for IL-23 in psoriasis. *J Immunol* 2010; 185:5688.
  230. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008; 117:244.
  231. Tsoi LC, Spain SL, Knight J, et al. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nat Genet.* 2012;44:1341-1348.
  232. Tsoi LC, Iyer MK, Stuart PE, Swindell WR, Gudjonsson JE, Tejasvi T, et al. Analysis of long non-coding RNAs highlights tissue-specific expression patterns and epigenetic profiles in normal and psoriatic skin. *Genome Biol* 2015;16:24.
  233. Turner ML, Schnorfeil FM, Brocker T. MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function. *J Immunol.* 2011;187:3911-3917.

234. Urzainqui A. Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol*. 2007. 179: p. 7457-65.
235. Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, et al. The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol*. 1993; 101:701.
236. van de Kerkhof PC, Lammers AM. Intraepidermal accumulation of polymorphonuclear leukocytes in chronic stable plaque psoriasis. *Dermatologica*. 1987; 174:224.
237. van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol* 2009; 182:5836.
238. van der Fits L, van der Wel LI, Laman JD, et al. In psoriasis lesional skin the type I interferon signaling pathway is activated, whereas interferon-alpha sensitivity is unaltered. *J Invest Dermatol* 2004; 122:51.
239. Vejnar CE, Blum M, Zdobnov EM. miRmap web: Comprehensive microRNA target prediction online. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Web Server issue):W165-W168.
240. Villanova F, Di Meglio P, Nestle FO. Biomarkers in psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:ii104–10.
241. Wan Y, Wang Z, Shao Y, Xu Y, Voorhees J, Fisher G. UV-induced expression of GADD45 is mediated by an oxidant sensitive pathway in cultured human keratinocytes and in human skin in vivo. *Int J Mol Med*. 2000;6:683-688.
242. Wang F, Lee E, Lowes MA, et al. Prominent production of IL-20 by CD68+/CD11c+ myeloid-derived cells in psoriasis: Gene regulation and cellular effects. *J Invest Dermatol* 2006; 126:1590.
243. Wang H, Peters T, Kess D, et al. Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasiform skin inflammation. *J Clin Invest*. 2006; 116:2105.

244. Wang H, Peters T, Sindrilaru A, et al. TGF-beta-dependent suppressive function of Tregs requires wild-type levels of CD18 in a mouse model of psoriasis. *J Clin Invest.* 2008; 118:2629.
245. Wei L, Debets R, Hegmans JJ, et al. IL-1 beta and IFN-gamma induce the regenerative epidermal phenotype of psoriasis in the transwell skin organ culture system. IFN-gamma up-regulates the expression of keratin 17 and keratinocyte transglutaminase via endogenous IL-1 production. *J Pathol.* 1999; 187:358.
246. Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, et al. Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *J Immunol.* 2001; 166:7563.
247. Wikner NE, Dixit VM, Frazier WA, Clark RA. Human keratinocytes synthesize and secrete the extracellular matrix protein, thrombospondin. *J Invest Dermatol.* 1987;88:207-211.
248. Williamson JC, Scheipers P, Schwa"mmle V, Zibert JR, Beck HC, Jensen ON. A proteomics approach to the identification of biomarkers for psoriasis utilising keratome biopsy. *J Proteomics* 2013;94:176–85.
249. Willis AI, Fuse S, Wang XJ, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C attenuates extracellular matrix protein-induced vascular smooth muscle cell chemotaxis. *J Vasc Surg* 2000;31:1160–7.
250. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007; 8:950.
251. Wolk K, Kunz S, Witte E, et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity.* 2004; 21:241.
252. Wolk K, Witte E, Wallace E, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2006; 36:1309.
253. Wolk K, Witte E, Warszawska K, et al. The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2009; 39:3570.

254. Wollenberg A, Wagner M, Günther S, et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol.* 2002; 119:1096.
255. Wrone-Smith T, Nickoloff BJ. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest.* 1996; 98:1878.
256. Xia YP, Li B, Hylton D, et al. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood.* 2003; 102:161.
257. Xu N, Meisgen F, Butler LM, et al. MicroRNA-31 is overexpressed in psoriasis and modulates inflammatory cytokine and chemokine production in keratinocytes via targeting serine/threonine kinase 40. *J Immunol.* 2013;190:678-688.
258. Xu N, Brodin P, Wei T, et al. MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *J Invest Dermatol.* 2011;131:1521-1529.
259. Yamauchi Y, Kuroki M, Imakiire T, et al. Thrombospondin-1 differentially regulates release of IL-6 and IL-10 by human monocytic cell line U937. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290:1551–7.
260. Yang K, Vega J, Hadzipasic M, Schatzmann Peron J, Zhu B, Carrier Y et al. Deficiency of thrombospondin-1 reduces Th17 differentiation and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Autoimmunity.* 2009;32:94-103.
261. Yang J, Zhu H, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM. IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol.* 2001;2:157-164.
262. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol.* 2010; 31, 220–227.
263. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, et al. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med* 2007; 204:3183.

264. Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol* 2009; 129:302.
265. Zaba LC, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, et al. Effective treatment of psoriasis with etanercept is linked to suppression of IL-17 signaling, not immediate response TNF genes. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:1022.
266. Zhang P, Su Y, Lu Q. Epigenetics and psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26:399–403.
267. Zhang P, Su Y, Zhao M, Huang W, Lu Q. Abnormal histone modifications in PBMCs from patients with psoriasis vulgaris. *Eur J Dermatol* 2011;21:552–7.
268. Zhang XJ, Huang W, Yang S, Sun LD, Zhang FY, Zhu QX, et al. Psoriasis genome-wide association study identifies susceptibility variants within LCE gene cluster at 1q21. *Nat Genet* 2009;41: 205–10.
269. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445:648.
270. Zhou L, Wang W, Yang C, et al. GADD45a Promotes Active DNA Demethylation of the MMP-9 Promoter via Base Excision Repair Pathway in AGEs-Treated Keratinocytes and in Diabetic Male Rat Skin. *Endocrinology*. 2018;159:1172-1186.
271. Zhou, X. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiol Genomics*, 2003. 13: p. 69-78.
272. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010; 116:e74–80.

# 11. Anexos

## 11.1 Consentimiento informado

### CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN

Línea de investigación: “**IDENTIFICACIÓN DE TROMBOSPONDINA-1 Y GADD45-alfa COMO BIOMARCADORES DE GRAVEDAD Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON PSORIASIS.**” Le proponemos participar en un proyecto de investigación que estamos realizando sobre la enfermedad que usted padece, la psoriasis. El objetivo de este proyecto es buscar una relación entre la expresión de estas moléculas que tiene cada persona y la forma de responder a los fármacos. Estas moléculas son un tipo de sustancia pequeña con múltiples funciones. La disregulación de la expresión de este material se ha asociado a diferentes enfermedades incluidas las enfermedades autoinmunes. Nuestro objetivo es determinar si estas moléculas pueden funcionar como un biomarcador que permita predecir la respuesta al tratamiento farmacológico.

Si decide participar se le realizarán dos biopsias cutáneas (una al inicio del estudio y otra a las 12-16 semanas de iniciado el tratamiento) de 3mm cada una que se harán coincidir con otros procedimientos para no tener que pincharle simplemente por este estudio. Además, se van a recoger datos de su historia clínica como edad, sexo y fármacos que ha recibido y cómo ha respondido a ellos. Sus datos codificados serán incorporados a un archivo informático radicado en estos Hospitales y analizados posteriormente.

La participación en este estudio no supone ningún riesgo para usted porque no se va a modificar su asistencia médica, y tampoco es previsible que le proporcione ningún beneficio concreto. En el momento actual los marcadores analizados en este estudio no se han relacionado con el riesgo de desarrollar enfermedades, pero no sabemos si en el futuro se puede encontrar alguna relación.

Los resultados obtenidos no serán útiles para un paciente concreto en la actualidad, ni le proporcionarán ningún beneficio adicional; únicamente aumentará nuestro conocimiento sobre su enfermedad y los factores que determinan una mejor o peor respuesta a los diversos tratamientos, por lo que quizás pueda ser de utilidad para otros pacientes con psoriasis en el futuro.

Si los resultados obtenidos tuviesen trascendencia para usted o sus familiares, le informaremos de los mismos, proporcionándole el consejo genético adecuado, según lo establecido en el artículo 47 de la Ley de Investigación Biomédica 15/2007. Sería conveniente que en este caso usted informe a sus familiares.

En todo momento se respetará su confidencialidad de acuerdo a la Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999. Aunque los resultados sean publicados, no se revelará su identidad. Debe usted saber que también se respetará su derecho a conocer los

resultados o a decidir que no se le comuniquen los datos obtenidos. No obstante, cuando esta información, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta con el comité de ética. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para esta finalidad.

Finalmente, debe saber que usted es libre de decidir si quiere participar en este estudio, sin que se vea perjudicada su atención médica por ello. Además, podrá retirar su consentimiento en cualquier momento sin necesidad de tener que dar explicaciones y sin ningún perjuicio en su atención sanitaria. Si decide retirar su consentimiento después de habernos facilitado la muestra de sangre, tiene que avisarnos para que su muestra sea destruida. No obstante, no se destruirán los datos que hayan sido obtenidos hasta entonces.

Si tiene alguna duda sobre la información que acaba de leer, pregunte al médico que le ha facilitado esta hoja. Si en el futuro surge algún problema relacionado con el estudio, puede contactar con su médico o con los investigadores del estudio (Dr. Pedro Rodríguez y Dra. Mar Llamas del Servicio de Dermatología, teléfono 915202433).

Yo (nombre y apellido) .....en calidad de  
(paciente/otra relación con el paciente/testigo).....  
de (Nombre y apellidos del paciente en caso de que no lo firme  
él/ella)..... declaro que he leído o  
le he leído al paciente la hoja de información del estudio.

1. Entiendo que la realización de la exploración clínica realizada y la toma de fotografías para la documentación cutánea, servirá al doble objetivo de valoración y tratamiento en práctica clínica habitual así como para el posterior estudio de los datos derivados de la mismas con la finalidad de conocer la implicación de las moléculas mencionadas en los procesos de la patogénesis la psoriasis.
2. Entiendo que la aplicación de los datos que puedan encontrarse en la realización de este estudio pueden no ser directamente aplicables a mi caso particular.
3. Entiendo que mi participación es voluntaria y puedo revocar la autorización de participar en el estudio.

Nombre del participante:\_\_\_\_\_ Firma y Fecha  
Nombre del investigador:\_\_\_\_\_ Firma y Fecha

### **CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION (CONTROLES).**

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

#### **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA**

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

#### **OBJETIVOS DEL ESTUDIO.**

Se están estudiando diferentes biomarcadores que permitan predecir la respuesta al tratamiento farmacológico en pacientes con psoriasis.

#### **Procedimientos**

Si acepto participar en este estudio, como resultado de mi participación:

- Se me requerirá que lea y firme este consentimiento tras responder a todas mis dudas.
- Se me realizará la extracción extra de 1mL de sangre en mi próxima analítica.
- Los datos y muestras biológicas obtenidos serán empleadas con doble finalidad; diagnóstica y de investigación, sin que esta segunda finalidad repercuta en el tipo o frecuencia de seguimiento del paciente.

#### **DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO SOBRE LA PROTECCIÓN DE DATOS**

Estoy conforme con la participación en el estudio mencionado anteriormente. Me han sido comunicados los objetivos de dicho estudio y estoy de acuerdo en que dentro del marco del estudio científico mis datos personales y médicos sean procesados, almacenados y valorados científicamente, de forma anónima, por el personal del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario De La Princesa. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito



y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

#### OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE.

Este proyecto no está financiado y soy consciente de que no recibiré ninguna remuneración con mi participación.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, usted se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

---

Lugar, fecha y firma del paciente

---

Firma del facultativo que informa

Ante cualquier problema o efecto secundario podrán contactar en horario de mañana con la Dra Llamas Velasco o el Dr. Pedro Rodríguez a través del 9152010330.

## 11.2 Publicaciones asociadas

Las líneas de investigación de la presente tesis fueron presentadas en forma de comunicación oral en la reunión de la Sección centro de la Academia Española de Dermatología y Venereología en junio de 2018.

El trabajo directo de la tesis, antes de la defensa de la presente tesis doctoral, ha dado lugar a dos publicaciones doctorales. Una de ellas ya publicada en un artículo original:

- Rodríguez-Jiménez P, Chicharro P, Llamas-Velasco M, Cibrian D, Trigo-Torres L, Vara A, Jiménez-Fernández M, Sevilla-Montero J, Calzada MJ, Sánchez-Madrid F, de la Fuente H, Daudén E. Thrombospondin-1/CD47 Interaction Regulates Th17 and Treg Differentiation in Psoriasis. *Front Immunol*. 2019 Jun 4;10:1268. doi: 10.3389/fimmu.2019.01268. PMID: 31214201; PMCID: PMC6558197.
- Revista: *Frontiers Immunology*. Factor de impacto en 2018 (6.429)

Y un segundo trabajo original que se encuentra en revisión:

- Rodríguez-Jiménez P, Fernández-Messina L, Ovejero C, Chicharro P, Vara A, Martínez-Fleta P, Jiménez-Fernández M, Sánchez-García I, Llamas-Velasco M, Sánchez-Madrid F, Abad F, Dauden E, de la Fuente H. Expression and interactions of Growth Arrest and DNA Damage-inducible proteins (GADD45) in Psoriasis. *Br J Dermatol* [En revisión].
- Revista: *British Journal of Dermatology*. Factor de impacto en 2018 (6.714)

Así mismo, en paralelo, han dado lugar a participar en líneas de investigación relacionadas que han dado lugar a las publicaciones:

1. Martínez-Hernández R, Fuente H, Lamana A, Sampedro-Núñez M, Ramos-Levi A, Serrano-Somavilla A, García-Vicuña R, Ortiz AM, Daudén E, Llamas-Velasco M, Chicharro P, Rodríguez-Jiménez P, Sanz-García A, Sánchez-Madrid F, González-Álvaro I, Marazuela M. Utility of circulating serum miRNA profiles to evaluate the potential risk and severity of immune-mediated inflammatory disorders. *J Autoimmun.* 2020 Jul;111:102472. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102472. Epub 2020 May 5. PMID: 32381457.
2. Chicharro P, Rodríguez-Jiménez P, Llamas-Velasco M, Montes N, Sanz A, Cibrian D, Vara A, Gómez M, Jiménez-Fernández M, Martínez-Fleta P, Sánchez-García I, Lozano-Prieto M, Triviño J, Miñambres R, Sánchez-Madrid F, Dauden E. Expression of miR-135b in psoriatic skin and its association with disease improvement. *Cells* [En revisión].
3. Chicharro P, Rodríguez-Jiménez P, De la Fuente H, Fraga-Fernández J, Cibrian D, Sánchez-Madrid F, Daudén E. Mixed profile of cytokines in paradoxical eczematous eruptions associated with anti-IL-17 therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [En revisión].



# Thrombospondin-1/CD47 Interaction Regulates Th17 and Treg Differentiation in Psoriasis

Pedro Rodríguez-Jiménez<sup>1</sup>, Pablo Chicharro<sup>1</sup>, Mar Llamas-Velasco<sup>1</sup>, Danay Cibrian<sup>2</sup>, Laura Trigo-Torres<sup>2</sup>, Alicia Vara<sup>2</sup>, María Jiménez-Fernández<sup>2</sup>, Javier Sevilla-Montero<sup>2</sup>, María J. Calzada<sup>2</sup>, Francisco Sánchez-Madrid<sup>2,3</sup>, Hortensia de la Fuente<sup>2,3\*</sup> and Esteban Daudén<sup>1†</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

J. Michelle Kahlenberg,  
University of Michigan, United States

### Reviewed by:

Thomas S. McCormick,  
Case Western Reserve University,  
United States  
David D. Roberts,  
National Institutes of Health (NIH),  
United States

### \*Correspondence:

Hortensia de la Fuente  
hortensia.fuente@salud.madrid.org

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Autoimmune and Autoinflammatory  
Disorders,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 25 January 2019

Accepted: 17 May 2019

Published: 04 June 2019

### Citation:

Rodríguez-Jiménez P, Chicharro P,  
Llamas-Velasco M, Cibrian D,  
Trigo-Torres L, Vara A,  
Jiménez-Fernández M,  
Sevilla-Montero J, Calzada MJ,  
Sánchez-Madrid F, de la Fuente H and  
Daudén E (2019)  
Thrombospondin-1/CD47 Interaction  
Regulates Th17 and Treg  
Differentiation in Psoriasis.  
Front. Immunol. 10:1268.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.01268

<sup>1</sup> Department of Dermatology, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Hospital Universitario la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, <sup>2</sup> Department of Immunology, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Hospital Universitario la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, <sup>3</sup> CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Accumulating evidence on the role of Thrombospondin-1 (TSP-1) in the immune response has emerged during the last years. In spite of the importance of TSP-1 not only as anti-angiogenic factor but also as an immunomodulatory molecule, studies on the role of TSP-1 in psoriasis have been neglected. TSP-1 and CD47 expression were analyzed in skin samples from psoriasis patients and control subjects using RT-PCR and immunofluorescence. Expression of these molecules was also evaluated in peripheral blood CD4+ T cells, moDCs, and circulating primary DCs. The functional role of TSP-1/CD47 signaling axis in psoriasis was assessed in Th17 and Treg differentiation assays. Additionally, small interfering RNA assays specific to TSP-1 were performed in CD4+ T cells and monocyte derived DC to specifically evaluate the function of this protein. Lesional skin of psoriasis patients expressed lower TSP-1 and CD47 mRNA levels compared to non-lesional skin or skin from controls. Immunofluorescence staining revealed decreased expression of CD47 in CD45+ dermal cells from psoriasis samples compared to control subjects. Peripheral CD4+ T cells and circulating primary DCs from psoriasis also expressed lower levels of CD47 compared to controls. Although no significant differences were detected in TSP-1 expression in CD4+ T cells and moDCs between patients and controls, TSP-1 expression in psoriasis patients inversely correlated with disease activity evaluated by the Psoriasis Area and Index Activity. Furthermore, exogenous TSP-1 inhibited Th17 differentiation and stimulated the differentiation of CD4+ T cells toward Treg cells. Furthermore, RNA interference specific for TSP-1 confirmed the role of this molecule as a negative regulator of T cell activation. Because of the impact of TSP-1/CD47 signaling axis in Th17 and Treg differentiation, a dysregulated expression of these molecules in the immune cells from psoriasis patients may favor the exacerbated inflammatory response in this disease.

**Keywords: psoriasis, CD47, TSP-1, Th17, Treg cells**



## INTRODUCTION

Psoriasis is considered a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by exacerbated proliferation and disturbed keratinocyte maturation, inflammatory dermal infiltrates and changes of the superficial microvasculature that result in an angiogenic phenotype (1). This condition arises from interactions between keratinocytes, infiltrating Interleukin (IL)-17-, IL-22-, and interferon (IFN)- $\gamma$ -producing cells, inflammatory macrophages and dendritic cells (DCs) (2). Clinical investigations and experimental studies indicate that IFN- $\gamma$ -producing T helper type (Th)1 cells and CD4<sup>+</sup> Th17 cells accompanied by increased expression of IL-17A and accumulation of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells in psoriatic lesions cooperate at the interface of innate and adaptive immunity by activating keratinocytes to produce IL-17C. This cytokine together with other keratinocyte-derived mediators sustains chronic inflammation in psoriatic plaques (3–5). Although inflammation mediated by CD4<sup>+</sup> Th17 T cells is considered an important trigger in the development of psoriasis, the precise underlying immuno-inflammatory mechanisms are still to be fully defined.

The multicellular protein thrombospondin-1 (TSP-1) is highly considered for its role in vascular health and disease. TSP-1 modulates vascular response and at pathologic levels promotes vascular dysfunction (6, 7). TSP-1 regulates multiple cellular events involved in tissue repair including cell adhesion, migration, proliferation, extracellular matrix expression and organization, and regulation of growth factor activity (8). This is possible due to its multi-domain structure which interacts with several cell receptors and matrix proteins (9). Despite TSP-1 is mostly known for its role in modifying the tumor micro-environment through its anti-angiogenic properties (10), growing evidence about the role of TSP-1 in immune response has emerged in the last decade (11–13).

TSP-1 is known to regulate the conversion of tumor growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) from latent to an active form (14). On the other hand, TGF- $\beta$ 1 is a potent keratinocyte growth inhibitor, and its signaling pathway is downregulated in psoriatic skin leading to abnormal cell proliferation due to a functional decrease in growth regulation (15, 16). Independently of TGF- $\beta$  regulation, TSP-1 may also have suppressive properties by means of its interaction with CD47 in T cells (17). Particularly, in T CD4<sup>+</sup> lymphocytes TSP-1/CD47 interaction promotes an anti-proliferative effect as well as the generation of human peripheral regulatory T (Treg) cells (18–20). Furthermore, when released after the inflammatory response, the interaction between TSP-1 and CD47 reduces inflammation linked to T cell activation (20, 21). Interestingly, methotrexate stimulates the expression of endogenous TSP-1 in primary human T cells, which could explain its beneficial effects in psoriasis, due to its immunoregulatory effects (22). Human immature monocyte-derived DCs (moDCs) as well as are known to spontaneously produce TSP-1, this being enhanced by microbial stimuli (11). It has also been shown that increased TSP-1 levels during DC activation and its interaction with CD47 and CD36, negatively regulate IL-12, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IL-10 release (23–25). Although our knowledge

about the functional relevance of TSP-1 in psoriasis is scarce, a defective expression of TSP-1 in keratinocytes from psoriasis patients correlates with a higher angiogenic response (26). In this paper, we sought to the role of TSP-1/CD47 signaling axis in the development and maintenance of psoriatic lesions. Our results showed that TSP-1 binding to its receptor CD47 was able to inhibit the differentiation of Th17 cells and favor differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells toward Treg cells. Therefore, a diminished expression of TSP-1 and its receptor CD47 in immune cells from psoriasis patients may promote the exacerbated inflammatory response characteristic of this disease.

## METHODS

### Patients

This study was approved by the Institutional Review Board (IRB)/Independent Ethics Committee of Hospital de la Princesa according to the Declaration of Helsinki Principles. After giving informed consent, 20 healthy individuals and 30 untreated psoriatic patients were enrolled. Patients were eligible for the study if they had a Psoriasis Assessment Severity Index (PASI)  $\geq 8$ . The following washout periods were established: 14 days for topical corticosteroids, 28 days for systemic treatment including corticosteroids, methotrexate, cyclosporine, acitretin, or phototherapy and 3 months for biologic agents. From each psoriasis patient, two non-sun-exposed cutaneous biopsies (10 mm) were taken, one from lesional psoriatic skin and other from apparently healthy skin (non-lesional skin). At the same time, 20 ml of peripheral venous blood were obtained. Normal leftover skin samples and peripheral venous blood samples were obtained from 20 surgical patients. Each biopsy was cut in half; one piece was snap frozen for RNA isolation and the other one was embedded in OCT<sup>TM</sup> compound (Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processing for immunofluorescence.

### Expression of TSP-1 and CD47 mRNA Levels by RT-PCR

TSP-1 and CD47 mRNA expression levels were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was isolated from skin samples, peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells and moDCs using TRIzol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was reverse-transcribed to cDNA and amplified with the specific primers pairs (TSP-1 forward GCC ACA GTT CCT GAT GGA G, reverse CCA TGG AGA CCA GCC ATC; CD47 forward TCC ACA GCA CAG CCA AGG T, reverse TCG CAG ATG ACT TGA GAG TGA AC) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega, WI USA). The data were analyzed using StepOne Plus Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). TSP-1 and CD47 mRNA levels were normalized to GAPDH levels.

### Immunofluorescence Staining

Skin OCT sections of 5  $\mu\text{m}$  were fixed (formaldehyde 4%), permeabilized (Triton X-100 0,2%) and blocked with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  human gammaglobulin (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) and a 1:100 dilution of donkey serum (Sigma-Aldrich) in phosphate



buffer solution (PBS). Skin sections were then incubated overnight with 5 µg/ml sheep anti-human CD47 (R&D systems, Cat. AF4670) and mouse anti-human CD45, followed by donkey anti-sheep (DAS) Alexa Fluor 488 and donkey anti-mouse (DAM) Alexa Fluor 555. Finally, cell nuclei were counterstained with DAPI. Negative controls were performed with omission of the primary antibody. Sections were examined with a Leica DMR immunofluorescence microscopy under the same acquisition conditions. Images were analyzed using the ImageJ software (<http://imagej.softonic.com>). For the analysis of CD47 expression, fluorescence intensity was determined in regions of interest (ROIs) drawn on CD45+ cells.

### Peripheral Blood CD4+ T Cells and Monocyte Derived DCs (moDCs)

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by density gradient centrifugation and then CD4+ T cells were isolated by negative selection using magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). For moDCs, PBMCs were allowed to adhere for 30 min at 37°C, and plastic adhered cells were cultured for 5 days in complete media supplemented with 500 U/ml GM-CSF (Peprotech) and 10 ng/ml IL-4 (R&D systems). On day 6, 10 ng/ml LPS were added and after 24 h cells were harvested.

### Th17 and Treg Differentiation Assays

For Th17 differentiation, isolated CD4+ T cells were cultured for 10 days with anti-CD3 (BioLegend Cat# 300314, RRID:AB314050) plus anti-CD28 mAbs (BD, Cat#555725) (at 5 µg/ml and 2 µg/ml, respectively) in the presence of the combination of cytokines and blocking antibodies appropriate for polarization: rhIL-6 h IL-1β (10 ng/ml), rhIL-23 (20 ng/ml), rhTGF-β1 (2 ng/ml), anti-IFN-γ (10 µg/ml) and anti-IL-4 (10 µg/ml). For Treg polarization, cells were cultured with TGF-β (5 ng/ml) and IL-2 (20 U/ml) (all cytokines from R&D systems) for 5 days. Where indicated hTSP-1 (5 µg/ml), mouse anti-human CD47 (1 µg/ml) clone B6H12.2 (Abcam Cat# ab3283, RRID:AB303671) or IgG1 isotype control were also added. Percentage of IL-17+ and FoxP3+ CD25+ cells (Treg) was measured in a FACS Canto cytometer and analyzed with FlowJo software.

### siRNA Transfection

Transfections were carried out using 4-D Nucleofector and P3 primary cell kit (Amaxa Lonza, Köln, Germany). Unstimulated CD4+ T cells or immature moDCs ( $1 \times 10^6$  cells) were transfected with TSP-1 specific siRNA (50 pmol) selecting the EO-115 protocol from the 4-D Nucleofector for CD4+ T cells and the protocol CM-120 for moDCs. Immediately after nucleofection, cells were incubated in X-VIVO 15 (Lonza, Belgium) medium.

### Mixed Leukocytes Reaction (MLR) Assay

CD4+ T cells were co-cultured with moDCs from a different donor in 96-well U-bottom plates in X-VIVO 15 medium. The ratio of DCs and CD4+ T cells was 1:5. CD4+ T cells were preloaded with CellTrace Violet (Invitrogen, by Thermo

Fisher Scientific, OR USA) to follow cell proliferation. Cells were cultured for 5 days, then intracellular cytokine production and CellTrace Violet dilution was assessed by flow cytometry.

### Treg Suppression Assays

After 5 days of differentiation, Treg cells were isolated using magnetic beads and added to MLR cultures (ratio 1:2). Responder CD4+ T cells were from the same donor of Treg cells. Immediately before the co-culture, responder T cells were loaded with CellTrace Violet, while Treg cells were loaded with CFSE (Invitrogen). After 5 days of culture, proliferation of responder cells was evaluated by flow cytometry.

### Statistical Analysis

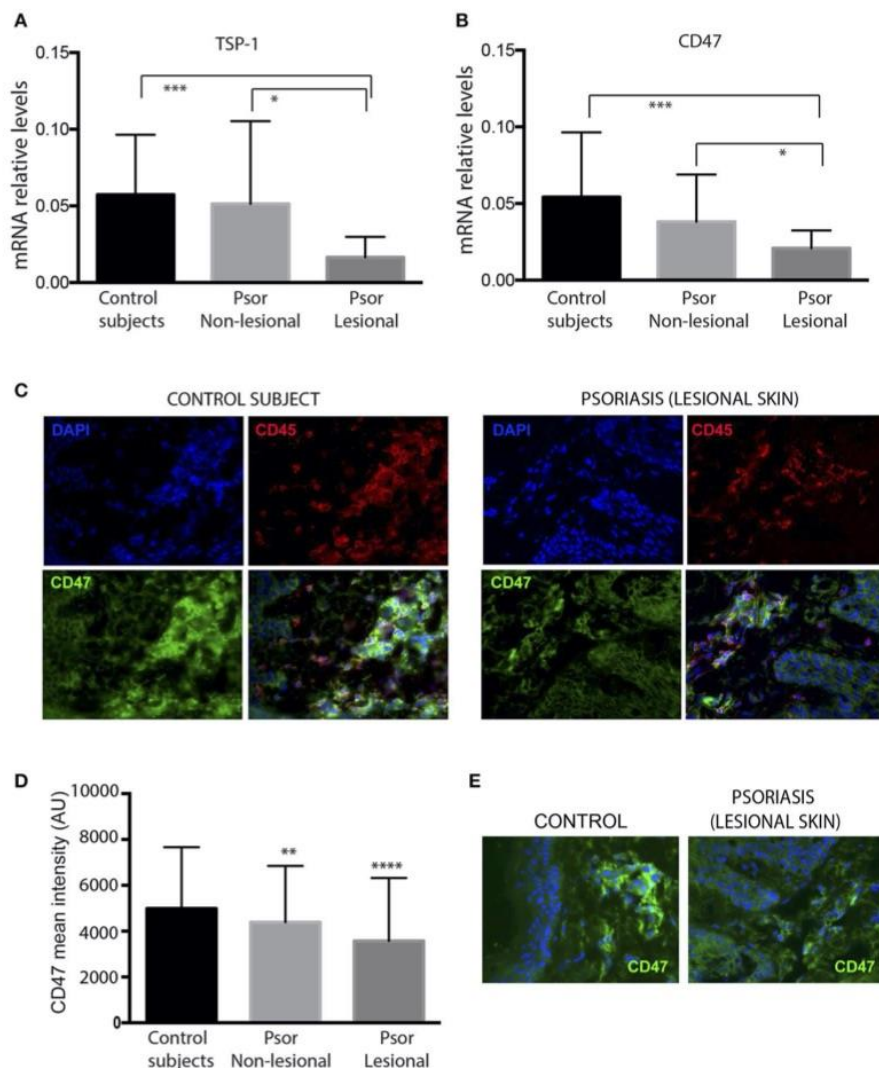
Data were analyzed with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). One Way Anova, Tukey test and Mann-Whitney *U*-test were used as appropriate. Where indicated, Wilcoxon signed rank test was used to paired data. Data from T cell differentiation assays were analyzed using Friedman test and Dunn's Multiple Comparison. The Spearman test was used for correlation analysis. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Expression of TSP-1 and CD47 was analyzed by RT-PCR in skin samples from psoriasis patients and healthy controls. Our data showed that lesional skin from psoriasis patients express lower levels of TSP-1 and CD47 compared to non-lesional skin or skin from control subjects (Figures 1A,B). Immunofluorescence assays showed that CD47 is expressed in the dermis and epidermis of both control and psoriasis skin samples. Furthermore, double immunostaining with CD45 identified the expression of CD47 in dermal leukocytes (Figure 1C). Quantitative analysis demonstrated diminished levels of CD47 in CD45+ dermal cells of psoriasis patients compared to cells from non-lesional skin or cells from control subjects (Figure 1D). Conversely, we did not observe any difference in the levels of CD47 in keratinocytes between psoriasis patients and healthy controls (Figure 1E).

Expression of CD47 and TSP-1 was also analyzed in peripheral blood CD4+ T cells and monocyte-derived DCs (moDCs). Our data showed that peripheral CD4+ T cells from psoriasis patients expressed lower levels of CD47 compared to healthy controls (Figure 2A). Although our results did not prove significant differences in TSP-1 mRNA levels between healthy subjects and psoriasis patients (Figure 2A), statistical analysis showed a negative correlation between TSP-1 expression and Psoriasis Assessment Severity Index (PASI) (Figure 2B). However, no correlation between CD47 expression and PASI was observed (Figure 2B).

The expression of TSP-1 and CD47 was also analyzed in moDCs under basal conditions or following activation with LPS. No significant differences were observed in the basal expression of TSP-1 and CD47 between psoriasis patients and healthy controls (Figure 2C). However, similarly to our findings in peripheral CD4+ T cells, TSP-1 expression levels in



**FIGURE 1** | Skin samples from psoriasis patients express lower levels of TSP-1, and CD47 compared with healthy controls. mRNA levels of TSP-1 (**A**) and its receptor CD47 (**B**) were analyzed by RT-PCR in skin samples from 26 psoriasis patients and 20 healthy controls. GAPDH expression was used to normalize gene expression. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ . (**C**) Double immunofluorescence staining of CD47 (green) and CD45 (red) in a representative skin sample from control subjects (left panels) and lesional skin from psoriasis patients (right panels) is shown. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (**D**) For quantification of immunofluorescence staining, fluorescence intensity of CD47 in CD45+ dermal cells was calculated using Image J software. (**E**) Representative expression of CD47 (green) in skin samples from control subjects and psoriasis patients. Graphs represent mean  $\pm$  SD. Differences between groups were determined by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test, \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

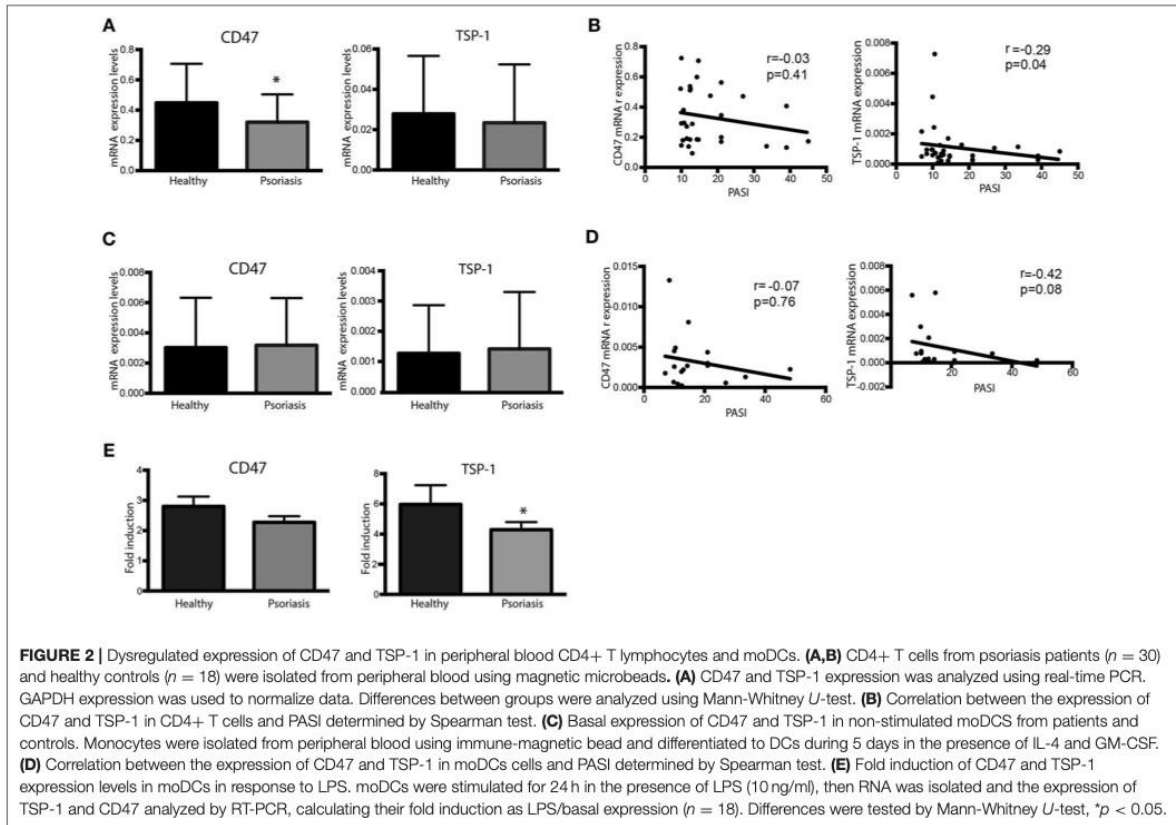
immature moDCs negatively correlated with PASI (**Figure 2D**). Interestingly, TSP-1 induction in response to LPS was lower in moDCs from psoriasis patients compared to controls, while no significant differences in CD47 expression levels were found (**Figure 2E**).

CD47 protein levels were evaluated by flow cytometry in plasmacytoid DCs (pDCs) and myeloid DCs (mDCs) from psoriasis patients and healthy controls. DCs were identified as HLA-DR<sup>+</sup> Lineage<sup>-</sup> (CD3, CD14, CD20, CD56) cells and then

selected according to CD123 and CD11c expression (pDCs and mDCs, respectively) (**Figure 3A**). Although CD47 protein levels were high in both pDCs and mDCs, we did not detect any significant difference in the expression of CD47 between both cell types (**Figure 3B**). However, both subsets of circulating DCs from psoriasis patients expressed significantly lower levels of CD47 compared to cells from healthy subjects (**Figures 3B,C**).

To evaluate the functional role of CD47 and TSP-1 in psoriasis inflammatory response we performed Th17 and Treg



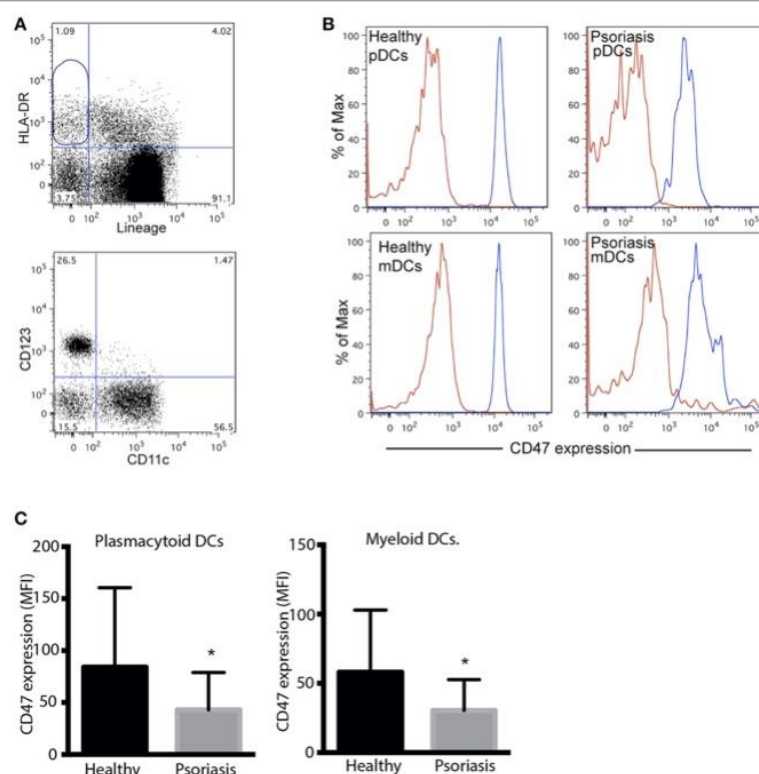


differentiation assays on peripheral CD4<sup>+</sup> T cells from psoriasis patients and healthy controls. CD4<sup>+</sup> T cells were incubated with the corresponding cocktail of cytokines, and in the presence of human TSP-1 or anti-CD47 mAb that mimics TSP-1 binding (20) (Figures 4A,B). Our results demonstrated a clear and significant reduction in the percentage of IL-17<sup>+</sup> cells when these cells were cultured in the presence of TSP-1 or anti-CD47 antibody (Figures 4A,C) in psoriasis patients (Friedman test  $p = 0.003$ ). Similar to our data from psoriasis patients, TSP-1 and anti-CD47 reduced the percentage of IL-17<sup>+</sup> cells in cell cultures from healthy donors (Friedman test  $p = 0.007$ ) (Figure 4C). In addition, we assessed whether TSP-1 or anti-CD47 mAb were able to affect Treg differentiation. Our results showed that the addition of TSP-1 induced a significant increment in the percentage of Treg (CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) cells in samples from psoriasis patients (Friedman test  $p = 0.03$ ) (Figures 4B,D). Although we observed a tendency for anti-CD47 to favor Treg differentiation, differences were not significant (Figure 4D). In order to analyze the functionality of CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells, we tested their ability to suppress T cell proliferation. Our data showed that CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells differentiated in the presence of TSP-1 or anti-CD47 mAb were able to inhibit the proliferation of T cells in a mixed leukocytes reaction (MLR) (Figure 4E). To

confirm the role of TSP-1 in CD4<sup>+</sup> T cell activation, siRNA-mediated silencing was performed. The levels of exogenously expressed TSP-1 were monitored by flow cytometry. As shown in Figure 4F, protein levels dropped in the presence of siRNA targeted to TSP-1. Both CD25 expression and IFN- $\gamma$  production were clearly augmented in T cells transfected with TSP-1-specific siRNA, when they were activated via TCR (Figure 4F).

Finally, the role of TSP-1/CD47 signaling axis was evaluated in antigen (Ag) presentation assays with autologous co-cultures of moDCs with CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and using the expression of CD25 as a marker of activation. These assays showed that the anti-CD47 mAb clearly prevented the activation of CD4<sup>+</sup> T cells during Ag presentation (Figure 5A) in cells from psoriasis patients. However, the addition of human TSP-1 had no significant effects on CD25 expression (Figure 5A). No significant differences were observed in the co-cultures of cells from control subjects (Figure 5A). These findings contrast with those observed in T cell differentiation and activation (Figure 4). The effect of exogenous TSP-1 could be dose dependent, and it is also important to remark that anti-CD47 (clone B6H12.2) not only mimics TSP-1 binding but blocks as well the binding of SIRP  $\alpha$  (27) expressed in DCs. Thus, to elucidate whether or not TSP-1 expressed by DCs





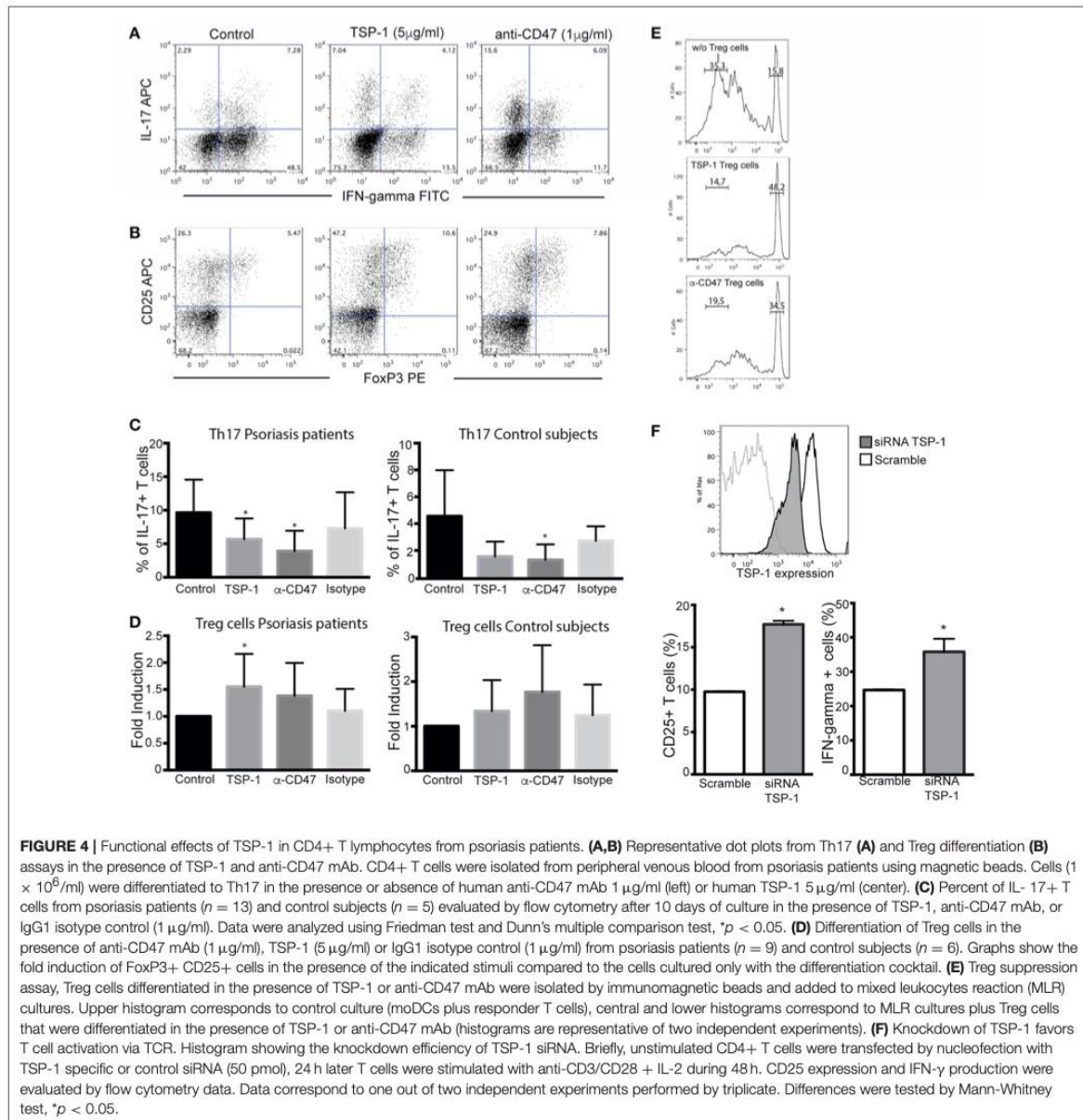
**FIGURE 3 |** Peripheral blood plasmacytoid and myeloid DCs from psoriasis patients express low levels of CD47. **(A)** Gating strategy for the detection of pDCs and mDCs. Dendritic cells were identified as HLA-DR positive, Lineage (CD3, CD14, CD20, CD56) negative, CD47 expression was then determined in CD123+ and CD11c+ by flow cytometry. **(B)** Representative histograms of CD47 expression in pDCs and mDCs from one patient and one control subject. Red and blue lines indicates isotype control and CD47 expression, respectively. **(C)** CD47 expression was calculated as mean fluorescence intensity (MFI) of CD47/MFI isotype control. Bars represent mean  $\pm$  SD from 18 psoriasis patients and 10 control subjects. Differences were analyzed by the Mann-Whitney *U*-test, \**p* < 0.05.

was playing a role in CD4<sup>+</sup> T cell activation, endogenous expression of TSP-1 was silenced in moDCs by siRNA assays. T cell activation in MLR assays, evaluated as CD25 expression, IFN- $\gamma$  production and proliferation, was augmented in the presence of moDCs transfected with TSP-1 siRNA (**Figure 5B**). These data demonstrate that TSP-1 expressed by moDCs is involved in the activation of CD4<sup>+</sup> T cells.

## DISCUSSION

TSP-1/CD47 signaling axis has been considered an important sensor to maintain homeostasis and regulate innate and adaptive immune responses (28). In this study we identified a defective expression of CD47 not only locally in dermal leukocytes, but also in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, pDCs, and mDCs from peripheral blood. The impact of CD47 deficiency in skin inflammation has been studied in animal models of contact hypersensitivity (CHS). An exacerbated T cell-mediated CHS response and prolonged inflammation indicate the importance of CD47 in different phases of the inflammatory response (21, 29). Moreover, a role during disease resolution in CHS has been observed in

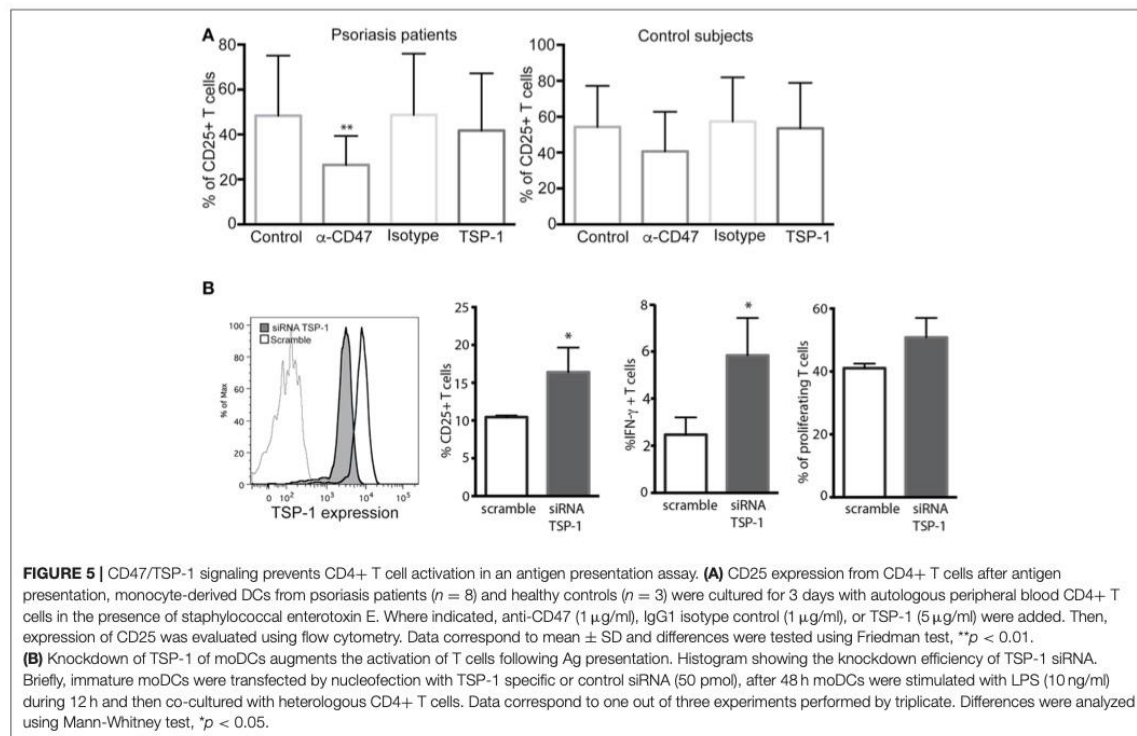
TSP-1 deficient mice (21). TSP-1 is present in low amounts in almost every tissue, but it is rapidly and transiently increased under stress or in damaged tissues in response to inflammatory signals (30). In healthy human skin, TSP-1 is produced by basal epidermal keratinocytes and is deposited in the dermo-epidermal basement membrane zone, contributing to the barrier that prevents the growth of blood vessels into the dermis. On the contrary, TSP-1 expression is downregulated in diseased skin, such as in skin squamous cell carcinomas (31) and in keratinocytes from psoriasis patients (26). T cells, macrophages and DCs may produce and express surface-bound TSP-1 (32–34). Our present results confirmed that TSP-1 levels are decreased in the skin of psoriasis patients, although no differences were detected in the expression of TSP-1 in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells or moDCs between patients and controls. However, we have shown that moDCs from psoriasis patients failed to upregulate TSP-1 expression in response to LPS. This is in agreement with the increase of TSP-1 in TLR-activated DCs vs. immature DCs observed by other authors (11). Thus, TSP-1 might be considered an important brake in psoriasis and this could be mediated by its dual effect impairing angiogenesis



in the skin and regulating Th17 and Treg cell differentiation. Results from *in vitro* experiments have previously demonstrated that exogenously added TSP-1 or CD47-binding TSP-1 peptide inhibit IL-12 secretion by monocytes in response to T cell-dependent stimuli (35). Moreover, TSP-1 co-stimulates TCR-activated T cells through its interaction with  $\alpha 4 \beta 1$  integrin (17). Our data demonstrate that TSP-1-CD47 interaction or the incubation with anti-CD47 mAb inhibits the differentiation of Th17 cells and favors CD4+ T cells differentiation into Treg cells from psoriasis patients. Topical administration of

a CD47-binding TSP-1 peptide during the development of an ocular inflammation has been described to attenuate clinical symptoms of Sjögren syndrome-associated dry eye and augment FoxP3 expression (36). This is in agreement with previous results suggesting that TSP-1-mediated activation of TGF- $\beta$ , as well as its binding to CD47 may create an anti-inflammatory environment in certain immune privileged sites such as the eye (37). It is well-established that CD47/SIRP  $\alpha$  interaction negatively regulates antigen presentation (27). The anti-CD47 (clone B6H12.2) used in our functional assays, has been described





to mimic TSP-1 binding but to also block the binding of CD47 with SIRP alpha. We cannot rule out that the blockade of CD47/SIRP alpha interaction is involved in the effects observed with anti-CD47 mAb. However, in line to previously published data this blockade would lead to a higher T cell activation instead of the inhibition detected in our assays (25, 27, 38). In the case of effects of exogenous TSP-1, it is difficult to reproduce the physiological concentration in that particular context. However, TSP-1 silencing assays clearly show that TSP-1 expressed by DCs acts as a negative regulator of immune response.

Together these data suggest that TSP-1 and its receptor CD47 may have a role in the exacerbated inflammatory response characteristic of psoriasis. The link between these molecules and the angiogenesis and immune regulation raises the possibility that they could be evaluated as activity markers in psoriasis.

## ETHICS STATEMENT

Comité de Ética de La investigación con Medicamentos del Hospital Universitario de la Princesa. All patients signed and Informed Consent

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

PR-J: acquisition and analysis data and drafting the manuscript. PC: acquisition data and drafting the manuscript. ML-V:

analysis and drafting the manuscript. DC: design experiments. LT-T and AV: acquisition data. MJ-F and JS-M: acquisition data, prepared figures and interpreted result. MJC: drafting the article and interpretation of data. FS-M: drafting the article and data interpretation. HdF and ED: design of the work, interpretation, critical revision of the manuscript, and final approval.

## FUNDING

Instituto de Salud Carlos III (AES 2017): PI17/01972 to ED. Janssen; Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO): Plan Nacional de Salud SAF2017-82886-R, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV); Proyecto Integrado de Excelencia PIE13/00041, Instituto de Salud Carlos III to FS-M, Instituto de Salud Carlos III PI16/02166, Universidad Autónoma de Madrid-Banco Santander (grant 2017/EEUU/03), and Red Temática de Excelencia en Investigación en Hipoxia (SAF 2017-90794-REDT) to MJC. This research has been co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Manuel Gomez Gutierrez for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu Rev Pathol.* (2012) 7:385–422. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132448
- Hawkes JE, Chan TC, Krueger JG. Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *J Allergy Clin Immunol.* (2017) 140:645–53. doi: 10.1016/j.jaci.2017.07.004
- Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. *Psoriasis vulgaris* lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol.* (2008) 128:1207–11. doi: 10.1038/sj.jid.5701213
- Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE, Johnston A, Aphale A, Vatan L, et al. Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN- $\gamma$ : mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J Immunol.* (2008) 181:4733–41. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4733
- Res PC, Piskin G, de Boer OJ, van der Loos CM, Teeling P, Bos JD, et al. Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PLoS ONE.* (2010) 5:e14108. doi: 10.1371/journal.pone.0014108
- Isenberger JS, Hyodo F, Pappan LK, Abu-Asab M, Tsokos M, Krishna MC, et al. Blocking thrombospondin-1/CD47 signaling alleviates deleterious effects of aging on tissue responses to ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2007) 27:2582–8. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.155390
- Labrousse-Arias D, Martinez-Ruiz A, Calzada MJ. Hypoxia and redox signaling on extracellular matrix remodeling: from mechanisms to pathological implications. *Antioxid Redox Signal.* (2017) 27:802–22. doi: 10.1089/ars.2017.7275
- Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* (2011) 3:a009712. doi: 10.1101/cshperspect.a009712
- Calzada MJ, Roberts DD. Novel integrin antagonists derived from thrombospondins. *Curr Pharm Design.* (2005) 11:849–66. doi: 10.2174/1381612053381792
- Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med.* (2002) 6:1–12. doi: 10.1111/j.1582-4934.2002.tb00307.x
- Doyen V, Rubio M, Braun D, Nakajima T, Abe J, Saito H, et al. Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J Exp Med.* (2003) 198:1277–83. doi: 10.1084/jem.20030705
- Derks RA, Jankowska-Gan E, Xu Q, Burlingham WJ. Dendritic cell type determines the mechanism of bystander suppression by adaptive T regulatory cells specific for the minor antigen HA-1. *J Immunol.* (2007) 179:3443–51. doi: 10.4049/jimmunol.179.6.3443
- Smith RE, Reyes NJ, Khandelwal P, Schlereth SL, Lee HS, Masli S, et al. Secondary allergic T cell responses are regulated by dendritic cell-derived thrombospondin-1 in the setting of allergic eye disease. *J Leuk Biol.* (2016) 100:371–80. doi: 10.1189/jlb.3A0815-357RR
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- $\beta$ 1 *in vivo*. *Cell.* (1998) 93:1159–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81460-9
- Li AG, Wang D, Feng XH, Wang XJ. Latent TGF $\beta$ 1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO J.* (2004) 23:1770–81. doi: 10.1038/sj.emboj.7600183
- Han G, Williams CA, Salter K, Garl PJ, Li AG, Wang XJ. A role for TGF $\beta$ 1 signaling in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol.* (2010) 130:371–7. doi: 10.1038/jid.2009.252
- Li Z, Calzada MJ, Sipes JM, Cashel JA, Krutzsch HC, Annis DS, et al. Interactions of thrombospondins with  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J Cell Biol.* (2002) 157:509–19. doi: 10.1083/jcb.200109098
- Wan X, Pei W, Shahzad KA, Zhang L, Song S, Jin X, et al. A tolerogenic artificial APC durably ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by directly and selectively modulating myelin peptide-autoreactive CD4(+) and CD8(+) T cells. *J Immunol.* (2018) 201:1194–210. doi: 10.4049/jimmunol.1800108
- Van VQ, Darwiche J, Raymond M, Lesage S, Bouguermouh S, Rubio M, et al. Cutting edge: CD47 controls the *in vivo* proliferation and homeostasis of peripheral CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells that express CD103. *J Immunol.* (2008) 181:5204–8. doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5204
- Grimbert P, Bouguermouh S, Baba N, Nakajima T, Allakhverdi Z, Braun D, et al. Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4+ CD25- T cells in response to inflammation. *J Immunol.* (2006) 177:3534–41. doi: 10.4049/jimmunol.177.6.3534
- Lamy L, Foussat A, Brown EJ, Bornstein P, Ticchioni M, Bernard A. Interactions between CD47 and thrombospondin reduce inflammation. *J Immunol.* (2007) 178:5930–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.9.5930
- Talme T, Bergdahl E, Sundqvist KG. Methotrexate and its therapeutic antagonists caffeine and theophylline, target a mitogenic T-cell mechanism driven by thrombospondin-1 (TSP-1). *Eur J Immunol.* (2016) 46:1279–90. doi: 10.1002/eji.201546122
- Avic MN, Rubio M, Sergerie M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J Immunol.* (2000) 165:4624–31. doi: 10.4049/jimmunol.165.8.4624
- Johansson U, Londei M. Ligation of CD47 during monocyte differentiation into dendritic cells results in reduced capacity for interleukin-12 production. *Scand J Immunol.* (2004) 59:50–7. doi: 10.1111/j.0300-9475.2004.01354.x
- Baba N, Van VQ, Wakahara K, Rubio M, Fortin G, Panzini B, et al. CD47 fusion protein targets CD172a+ cells in Crohn's disease and dampens the production of IL-1 $\beta$  and TNF. *J Exp Med.* (2013) 210:1251–63. doi: 10.1084/jem.20122037
- Nickoloff BJ, Mitra RS, Varani J, Dixit VM, Polverini PJ. Aberrant production of interleukin-8 and thrombospondin-1 by psoriatic keratinocytes mediates angiogenesis. *Am J Pathol.* (1994) 144:820–8.
- Latour S, Tanaka H, Demeure C, Mateo V, Rubio M, Brown EJ, et al. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein- $\alpha$ : down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol.* (2001) 167:2547–54. doi: 10.4049/jimmunol.167.5.2547
- Sarfati M, Fortin G, Raymond M, Susin S. CD47 in the immune response: role of thrombospondin and SIRP- $\alpha$  reverse signaling. *Curr Drug Targets.* (2008) 9:842–50. doi: 10.2174/138945008785909310
- Bouguermouh S, Van VQ, Martel J, Gautier P, Rubio M, Sarfati M. CD47 expression on T cell is a self-control negative regulator of type 1 immune response. *J Immunol.* (2008) 180:8073–82. doi: 10.4049/jimmunol.180.12.8073
- Raugi GJ, Olerud JE, Gown AM. Thrombospondin in early human wound tissue. *J Invest Dermatol.* (1987) 89:551–4. doi: 10.1111/1523-1747.ep12461198
- Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, et al. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol.* (1999) 155:441–52. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65140-1
- Li SS, Ivanoff A, Bergstrom SE, Sandstrom A, Christensson B, van Nerven J, et al. T lymphocyte expression of thrombospondin-1 and adhesion to extracellular matrix components. *Eur J Immunol.* (2002) 32:1069–79. doi: 10.1002/1521-4141(200204)32:4<1069::AID-IMMU1069>3.3.CO;2-5
- Marteau F, Gonzalez NS, Communi D, Goldman M, Boeynaems JM, Communi D. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. *Blood.* (2005) 106:3860–6. doi: 10.1182/blood-2005-05-1843
- Masli S, Turpie B, Hecker KH, Streilein JW. Expression of thrombospondin in TGF $\beta$ -treated APCs and its relevance to their immune deviation-promoting properties. *J Immunol.* (2002) 168:2264–73. doi: 10.4049/jimmunol.168.5.2264
- Armant M, Avic MN, Hermann P, Rubio M, Kiniwa M, Delespesse G, et al. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. *J Exp Med.* (1999) 190:1175–82. doi: 10.1084/jem.190.8.1175

36. Contreras Ruiz L, Mir FA, Turpie B, Masli S. Thrombospondin-derived peptide attenuates Sjogren's syndrome-associated ocular surface inflammation in mice. *Clin Exp Immunol.* (2017) 188:86–95. doi: 10.1111/cei.12919
37. Streilein JW, Masli S, Takeuchi M, Kezuka T. The eye's view of antigen presentation. *Hum Immunol.* (2002) 63:435–43. doi: 10.1016/S0198-8859(02)00393-2
38. Sun FJ, Zhang CQ, Chen X, Wei YJ, Li S, Liu SY, et al. Downregulation of CD47 and CD200 in patients with focal cortical dysplasia type IIb and tuberous sclerosis complex. *J Neuroinflamm.* (2016) 13:85. doi: 10.1186/s12974-016-0546-2

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Rodríguez-Jiménez, Chicharro, Llamas-Velasco, Cibrian, Trigo-Torres, Vara, Jiménez-Fernández, Sevilla-Montero, Calzada, Sánchez-Madrid, de la Fuente and Daudén. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





## Utility of circulating serum miRNA profiles to evaluate the potential risk and severity of immune-mediated inflammatory disorders

Rebeca Martínez-Hernández<sup>a,g,1</sup>, Hortensia de la Fuente<sup>b,c,1</sup>, Amalia Lamana<sup>c,1</sup>, Miguel Sampedro-Núñez<sup>a,g</sup>, Ana Ramos-Leví<sup>a,g</sup>, Ana Serrano-Somavilla<sup>a,g</sup>, Rosario García-Vicuña<sup>c</sup>, Ana M. Ortiz<sup>c</sup>, Esteban Daudén<sup>d</sup>, Mar Llamas-Velasco<sup>d</sup>, Pablo Chicharro<sup>d</sup>, Pedro Rodríguez-Jiménez<sup>d</sup>, Ancor Sanz-García<sup>e</sup>, Francisco Sánchez-Madrid<sup>b,f</sup>, Isidoro González-Álvarez<sup>c,\*</sup>, Mónica Marazuela<sup>a,g,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Endocrinology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Immunology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Rheumatology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Dermatology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

<sup>e</sup> Data Analysis Unit, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

<sup>f</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Spain

<sup>g</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER GCV14/ER/12), Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

microRNAs

Serum

Immune-mediated inflammatory disorders

Groves' disease

Psoriasis

Rheumatoid arthritis

### ABSTRACT

Immune-mediated inflammatory disorders (IMID) are a group of diseases that present inflammation as a major pathogenic mechanism. They affect 15% of the population and pose a heavy socio-economic burden. Despite the growing knowledge on the etiopathogenesis of these diseases and the marked improvement in their management, there is a lack of predictive markers of IMID development or severity suitable for early diagnosis and adjustment of treatment intensity. The possibility that certain circulating miRNA profiles could be used as biomarkers of risk of development and/or severity of several autoimmune diseases has fuelled the interest in using them to improve the selection of successful treatments. The multi-pronged approach proposed here sought to reveal circulating miRNAs and miRNA signatures that could act as new predictive biomarkers of IMID development and severity. Our results showed that the circulating levels of miR-19b and miR-26b were significantly decreased ( $p < 0.001$ ) in IMID patients compared to controls. Furthermore, receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that these miRNAs were suitable discriminators capable to identify an IMID, with areas under the curve (AUC) of 0.85 and 0.83, respectively. In addition, we established that miR-19a and miR-143 were significantly increased in IMID patients with severe disease ( $p < 0.05$ ). In summary, our findings identify two different miRNA signatures. One of them is associated with the presence of IMIDs and could lead to the development of tools for their early detection. The second signature is able to discriminate between mild and severe forms of these disorders and could be a putative tool to select patient candidates for a more intense treatment.

\* Corresponding author. Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: isidoro.ga@ser.es (I. González-Álvarez), monica.marazuela@salud.madrid.org (M. Marazuela).

<sup>1</sup> R.M.H., H.d.L.F. and A.L. contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102472>

Received 6 March 2020; Received in revised form 18 April 2020; Accepted 19 April 2020

0896-8411/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 11.3 Pies de figura y tablas.

<i>Figura 1: Presentación clínica de la psoriasis en placas</i>	<b><i>página 9</i></b>
<i>Figura 2: Histopatología de la psoriasis.</i>	<b><i>página 10</i></b>
<i>Figura 3: Características clínicas e histológicas de la psoriasis.</i>	<b><i>página 11</i></b>
<i>Figura 4: Modelo inmunopatogénico actual de la psoriasis.</i>	<b><i>página 13</i></b>
<i>Figura 5: Diferencias en expresión inmune en piel sana y piel lesional en pacientes con psoriasis.</i>	<b><i>página 14</i></b>
<i>Figura 6: Visión general ontológica y especialización funcional de las DCs</i>	<b><i>página 16</i></b>
<i>Figura 7: Componentes celulares inmunes de la piel psoriásica de apariencia normal e inflamada.</i>	<b><i>página 17</i></b>
<i>Figura 8: Células clave y mediadores en la transición de la inmunidad innata a la inmunidad adaptativa en la psoriasis.</i>	<b><i>página 31</i></b>
<i>Figura 9: Vías de iniciación y mantenimiento de la psoriasis.</i>	<b><i>página 32</i></b>
<i>Tabla 1: Fármacos biológicos aprobados para su uso en psoriasis y representación esquemática de su interacción con la fisiopatología de la psoriasis</i>	<b><i>página 36</i></b>
<i>Figura 10: Resumen de los genes modificados en las DCs en respuesta a la irradiación UV.</i>	<b><i>página 40</i></b>
<i>Figura 11: Visión general de los receptores de la TSP-1, las vías celulares y los tipos de células influenciadas por la TSP-1</i>	<b><i>página 44</i></b>
<i>Tabla 2: Biomarcadores identificados en psoriasis.</i>	<b><i>página 49</i></b>
<i>Figura 12: Situación actual de la terapéutica.</i>	<b><i>página 49</i></b>
<i>Figura 13: Utilidad de la medicina personalizada</i>	<b><i>página 50</i></b>
<i>Figura 14: Las muestras de piel de pacientes con psoriasis expresan niveles más bajos de TSP-1, y CD47 en comparación con los controles sanos.</i>	<b><i>página 58</i></b>
<i>Figura 15: Expresión desregulada de CD47 y TSP-1 en los linfocitos T CD4+ de la sangre periférica y en los moDC.</i>	<b><i>página 60</i></b>

*Figura 16: Las células dendríticas plasmocitoides de la sangre periférica y mieloides de los pacientes con psoriasis expresan niveles bajos de CD47* **página 62**

*Figura 17: Efectos funcionales de la TSP-1 en los linfocitos T CD4+ de los pacientes con psoriasis.* **página 64**

*Figura 18: La señalización de CD47/TSP-1 evita la activación de los linfocitos T CD4+ en un ensayo de presentación de antígenos.* **página 67**

*Figura 19: Niveles disminuidos de ARNm de GADD45A en piel lesional.* **página 74**

*Figura 20: Expresión del patrón GADD45a en la piel de los pacientes con psoriasis.* **página 75**

*Figura 21: Correlación entre la inflamación local en piel y los niveles de GADD45a usando IFN-gamma como marcador de la inflamación en la piel.* **página 76**

*Figura 22: Las células T CD4+ de la sangre periférica de la psoriasis expresan altos niveles de GADD45.* **página 77**

*Figura 23: No hay diferencias en la activación de la p38 en la célula T CD4+ de los pacientes con psoriasis.* **página 78**

*Figura 24. Los DC inmaduros derivados de monocitos de la psoriasis expresan niveles bajos de GADD45.* **página 79**

*Figura 25. La piel lesional de los pacientes con psoriasis expresa niveles bajos de UCHL1 que se correlacionan con los niveles de GADD45A.* **página 80**

*Tabla 3. Sitios de CpG metilados diferencialmente en el promotor UCHL1 en muestras de piel de pacientes con psoriasis* **página 81**



## 11.4 Acrónimos más utilizados.

*Nota: Algunos acrónimos aparecen en su forma inglesa por reproducción exacta de la fuente original o por ser su uso más generalizado en la comunidad científica..*

- ADN o DNA: Ácido desoxiribonucleico
- Ag: Antígenos.
- ARN o RNA: Ácido ribonucleico.
- ARNm o RNAm: ARN mensajero.
- CD: *Cluster* de diferenciación, (siempre seguido de un número a diferencia de célula dendrítica)
- CMH o MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad, de *major histocompatibility complex*.
- CPA: Célula presentadora de antígenos.
- DC: Célula dendrítica de *dendritic cell*.
- eDC: Células dendríticas epidérmica, de *epidermic dendritic cells*.
- ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.
- GADD45: Proteína de arresto de crecimiento e inducible por daños en el AD, de *Growth Arrest and DNA Damage*.
- GWAS: Estudio de asociación de genoma completo, de *genome width association study*.
- HLA: antígenos leucocitarios humano, de *human leucocyte antigens*.
- IFN: Interferon.
- IHQ: Inmunohistoquímica.
- IL: Interleuquina o Interleuquina.
- iNOS: Oxido nítrico sintentasa inducible, *inducible nitric oxide synthase*
- LC: Célula de Langerhans, del inglés *Langerhans cells*
- lncRNA: RNA largo no codificado, de *long non codifying RNA*.
- LPS: Lipopolisacáridos.
- mAb: Anticuerpo monoclonal, de *monoclonal antibody*.
- mDCS Células dendríticas mieloides.
- miRNA: microRNA.
- moDCs: Células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos humanos, de *Human immature monocyte-derived dendritic cells*.
- MS: espectrometría de masas, de *mass spectrometry*.
- PASI: Índice de gravedad y área de la psoriasis, de *Psoriasis Area and Severity Index*.
- pDC: Células dendríticas plasmocitoides.
- S100A7: Psoriasina.
- siRNA: RNA silenciado, de *silenced RNA*.
- TGF-  $\beta$ : factor de crecimiento tumoral  $\beta$ , de *tumoral growth factor beta*.
- Th: T *helper*, de Linfocito T *Helper*.
- TLR: *Toll like receptor*.

- TNF-  $\alpha$  o TNF-a: Factor de necrosis tumoral alfa, de *tumoral necrosis factor alpha*.
- TNF: Factor de necrosis tumoral, de *tumoral necrosis factor*.
- Treg: Linfocitos T reguladores.
- TSP: Trombospondina.
- VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular, de *vascular endotelial growth factor*.

## 11.5 Material suplementario.

Biomarcadores de expresión génica	La piel de pacientes con psoriasis presenta una disregulación en la expresión de numerosos genes. Bowcock et al, identificaron un total de 177 genes expresados diferencialmente en la piel lesional en comparación con piel sana. Más del 90% de estos genes resultó estar sobreexpresado [Bowcock et al. 2001]. En un estudio más amplio, Gudjonsson et al, identificaron la disregulación de 918 genes en la piel psoriásica, 548 de ellos sobreexpresados. La mayoría de los genes sobreexpresados correspondían a moléculas asociadas a la respuesta inmune, el ciclo celular o la diferenciación de queratinocitos [Ding et al. 2010].
Biomarcadores identificados con tecnología convencional	Mediante ELISA, <i>Western blotting</i> , bioplex e inmunohistoquímica (IHQ) se realizaron los primeros estudios que determinaron que los niveles séricos de marcadores de inflamación inespecíficos, incluyendo la proteína C-reactiva, la plaqueta P-selectina, la haptoglobina, el componente del complemento 3 (C3), y C4 [Rocha-Pereira et al 2004, Garbaraviciene et al. 2010], así como algunas citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , El IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-8, IL-12, y IL-18, se encontraban incrementados en el suero de pacientes con [Villanova et al. 2013]. Por otro lado, la IL-33 es una miembro de la superfamilia de citoquinas IL-1, y su expresión está regulada al alza después de un estímulo pro-inflamatorio [Teoharides et al. 2010]. Recientemente, el grupo de DaErme y colaboradores describieron un grupo de genes asociados a IL-17/TNF alfa con perfiles de expresión que eran específicos de la piel psoriásica. Entre de ellos, el IL-36c demostró ser el marcador más notable. IL-36c se expresaba sólo en las lesiones de psoriasis y el nivel sérico de La IL-36c en la sangre periférica estaba estrechamente asociada con actividad de la enfermedad [DaErme et al. 2015].
Biomarcadores genómicos	En la actualidad se han descrito al menos 13 loci de susceptibilidad a la psoriasis (PSORS1-13) El PSORS1 es el locus de mayor susceptibilidad, que se cree que representa aproximadamente el 35%-50% de la heredabilidad de la psoriasis Dentro de los PSORS1, el HLA-Cw6 es el principal alelo

	<p>asociado con la psoriasis [Puig et al. 2012]. Estudios genéticos recientes, como el análisis de los polimorfismos de nucleótidos simples (<i>single nucleotide polymorphism o SNP</i>) como marcadores genéticos, la cartografía sistemática de los haplotipos humanos, y el desarrollo de plataformas de genotipificación de alto rendimiento, han creado un marco propicio para los estudios de asociación del genoma completo (<i>genome-wide association studies o GWAS</i>). Utilizando los GWAS, las fuertes asociaciones de fenotipos de enfermedades con los PSORS1 región han sido confirmados, y nuevos genes asociados otros que el MHC también han sido identificados. Exceptuando variantes de IL12B, IL23R, y IL-23A [Capon et al. 2007, Gudjonsson et al. 2009], estos estudios incluyen genes codificantes de la proteína <i>zinc-finger 313</i> (ZNF313), TNFAIP3- proteína interactiva1 (TNIP1) , y la proteína inducida por el TNF 3 (TNFAIP3) [Hüffmeier et al. 2010]] dentro de la vía del factor nuclear <math>\kappa</math>B (NF-<math>\kappa</math>B), así como una región genética que se cree que está involucrada en la regulación del sistema inmunológico innato y la apoptosis. Recientemente, como resultado de un meta-análisis compuesto de tres GWAS junto con dos conjuntos de datos independientes que fueron genotipados a través de inmunochip, se han identificado 15 nuevas susceptibilidades para la psoriasis en regiones del Cáucaso. Los genes recién identificados codifican proteínas que regulan la función de las células T, como la RUNX3, STAT3, y TAGAP [Tsoi et al. 2012]. Otros genes candidatos notables incluía a los involucrados en la activación de los macrófagos (ZC3H12C), la señalización NF-<math>\kappa</math>B (CARD14 y CARM1), y la señalización mediada por IFN respuestas antivirales (DDX58) [Tsoi et al. 2012]. El análisis mediante GWAS examinando tanto los SNP como variantes libres identificaron que la proteína del sobre cornificado está así mismo fuertemente asociada con la psoriasis [Zhang et al. 2009]. Por último, las beta defensinas puede ser otro potencial campo de interés para la psoriasis. Se tratan de pequeños péptidos antimicrobianos que se segregan en la epidermis para protegerse de invasión microbiana. Se han encontrado asociaciones significativas entre las número de copias genómicas para el grupo de genes de la beta-defensina y el riesgo de psoriasis en una cohorte holandesa y alemana [Hollox et al. 2008]. Estos</p>
--	---

	<p>biomarcadores genómicos han proporcionado algunos conocimientos en los mecanismos potenciales que desencadenan los diferentes fenotipos de la psoriasis en individuos genéticamente susceptibles.</p>
Biomarcadores transcriptómicos	<p>Las alteraciones en la expresión de los genes ocurren en la etapa temprana de la psoriasis, incluso antes de que se produzcan las lesiones cutáneas psoriásicas. Al examinar las transcripciones con una expresión notablemente alterada (punto de corte determinado en &gt;1,3 veces) mediante el análisis de grupos de genes, se identificó un grupo de genes entre los que se encuentran los genes que codifican el receptor activador de la proliferación del peroxisoma alfa (PPARα), la proteína reguladora del elemento vinculante del esteroide (SREBF), y el receptor de estrógeno 2 (ESR2). Estos genes mostraron un patrón de expresión altamente correlacionado y están involucrados en el metabolismo de los lípidos. Las dramáticas alteraciones en la expresión de estos factores de transcripción apuntan hacia una firma "prepsoriásica", que se caracteriza por el aumento de la inmunidad innata y la disminución de la biosíntesis de los lípidos, en comparación con la piel normal [Gudjonsson et al. 2009].</p> <p>El primer transcriptoma asociado a la psoriasis se notificó en 2001 utilizando una plataforma de Affymetrix (HuGeneFL<sup>®</sup>), que abarcaba 159 genes [Oestreicher et al. 2001]. Estos estudios proporcionan un grupo de genes candidatos que podrían servir tanto como dianas para una nueva intervención terapéutica como marcadores sustitutivos/predictivos para el resultado del tratamiento. Gudjonsson y otros identificaron transcripciones de 918 genes únicos usando microarrays de ARN (Affymetrix, HU133 más 2.0 arrays). Los genes significativamente aumentados incluían DEFB4, PI3 y SERPINB4, así como varios miembros de la familia S100A. Por otro lado, los genes significativamente disminuidos incluyen los que codifican el factor inhibidor de Wnt-1 (WIF1), CCL27, y la betacelulina (BTC) [Gudjonsson et al. 2010].</p> <p>Un estudio reciente que utilizó <i>microarrays</i> de ARN (Affymetrix, HU133 2.0<sup>®</sup>) de Suarez-Fariñas y colaboradores encontraron 4175 transcripciones expresadas en forma diferencial en las lesiones psoriásicas frente a las muestras no lesionales. Aproximadamente el 60% de los 20</p>

	<p>principales genes regulados al alza, como el S100A12, el SPRR2C y el CXCL1, tenían respuestas aditivas o sinérgicas a la IL-17 y a el TNF, lo que sugiere que estas citoquinas serán importantes para la creación de un perfil molecular de la psoriasis. Además, se ha confirmado que la renina, un gen que se sabe que está implicado en la vía de señalización de la renina-angiotensina, se expresa de forma diferencial en las lesiones cutáneas de la psoriasis [Suarez-Fariñas et al. 2012]. Esos genes vinculan la psoriasis a las vías de la enfermedad metabólica, así como a la vía del riesgo cardiovascular.</p>
Biomarcadores epigenéticos	<p>Los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, los microRNA (miRNA), la expresión de ARN no codificante largo (lncRNA), y modificaciones de las histonas, podrían causar alteraciones en la expresión de los genes y la remodelación de la cromatina, representando los posibles vínculos entre la exposición ambiental y la psoriasis [Zhang et al. 2012]. Los miRNAs puede llevar a un silenciamiento de genes objetivo, y sus niveles en el suero pueden ser biomarcadores útiles para el diagnóstico y el pronóstico con valor terapéutico adicional en varias enfermedades. Los niveles de suero de miR-1266 eran significativamente más altas en pacientes con psoriasis, en comparación con los sujetos de control sanos. Además, El nivel sérico de miR-1266 mostró una débil correlación inversa con la puntuación del PASI así como superficie corporal de la piel involucrada [Ichihara et al. 2012].</p> <p>Por otro lado, las alteraciones epigenéticas del ADN pueden afectar a la expresión de los genes. Algunas de las sustancias sensibles a la metilación los genes, incluyendo LFA-1, SHP-1, y P16INK4a, se expresan de manera aberrante en pacientes con psoriasis [Zhang et al. 2012]. Roberson y colaboradores investigaron la metilación global de CpG en la psoriasis y mostró que el estado de metilación a más de 1000 CpG de metilación era diferente en las lesiones cutáneas psoriásicas en comparación con piel normal con correlaciones inversas entre la expresión de los genes cercanos y la metilación en estos sitios, incluyendo KYNU, OAS2, S100A12, y SERPINB3.</p>

	<p>Además, los niveles de metilación podrían restaurarse a los niveles normales después del tratamiento con anticuerpos anti-TNFα [Roberson et al. 2012]. Estos resultados sugieren que la predicción de la respuesta de la terapia usando la expresión genética es factible. De manera similar a la metilación, la modificación de las histonas es un mecanismo epigenético que afecta la expresión de los genes a través de la modificación de la cromatina. En los pacientes con psoriasis vulgaris, se observó la hipoacetilación de la histona H4 y el grado de hipoacetilación estaba inversamente correlacionado con los resultados de la PASI [Zhang et al. 2011]. Los resultados actuales sugieren que las alteraciones epigenéticas incluyendo la metilación del ADN, la modificación de las histonas y expresión de miARNs/incARNs pueden en el futuro jugar un papel crítico en la monitorización de la psoriasis.</p>
Biomarcadores metabolómicos	<p>La metabolómica es un enfoque emergente en el campo de la biología de sistemas que se enfoca en el estudio científico de los procesos químicos que involucran metabolitos. Específicamente MEDIANTE EL estudio sistemático de las huellas que dejan los procesos celulares específicos en su paso de una muestra biológica. [Bujak et al. 2014]. No obstante, actualmente son limitados los estudios y datos exhaustivos en la intersección de metabolómica y psoriasis. Sitter y colaboradores examinaron y compararon los patrones metabólicos entre la piel no afectada y la piel afectada, así como la piel psoriásica tratada con corticoides con espectroscopia de resonancia magnética nuclear 1D-1H. Encontraron niveles metabólicos más bajos de glucosa y mio-inositol, pero niveles más altos de taurina y colina en las biopsias de tejido de la piel psoriásica en comparación con la piel no afectada, teniendo interés que los niveles de colina se redujeron en los casos con una buena respuesta terapéutica [Sitter et al. 2013].</p>
Biomarcadores proteómicos	<p>La proteómica consiste en el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de sus estructuras y funciones. En los últimos años se han descubierto algunos biomarcadores para la psoriasis mediante tecnología proteómica. En 2004, se realizó el primer estudio de la psoriasis utilizando</p>

	<p>el análisis de proteomas para examinar los patrones de expresión global de la proteína de la piel lesional y no lesional de sujetos con psoriasis crónica en placas y psoriasis guttata aguda mediante electroforesis en gel bidimensional (2D-GE) con espectrometría de masas (MS) [Carlen et al. 2004]. Se encontró que la expresión de 12 proteínas estaba aumentada más de 2 veces, incluyendo el antígeno del carcinoma de células escamosas (SCC), la citoqueratina14, la citoqueratina17 y el RhoGDI 1; o disminuida (por ejemplo, la citoqueratina15 y la calreticulina) en el grupo de la psoriasis en comparación con la piel normal. Para abordar las cuestiones relativas a la complejidad de las proteínas y el rango altamente dinámico antes de los análisis, Williamson y colaboradores utilizaron biopsias de piel y cultivo ex vivo para determinar biomarcadores subproteómicos "secretómicos" que reflejan la actividad enfermedad. Se identificaron mediante MS más de 50 proteínas frecuentemente alteradas en grandes cantidades en la piel psoriásica lesional frente a la no lesional. Entre ellas se incluyen múltiples proteínas relacionadas con la psoriasis, como la S100A7 (psoriasina) y la proteína de unión a los ácidos grasos epidérmicos (FABP5), así como la alteración de la expresión de más de 30 proteínas nuevas, como la profilina 1, la proteína relacionada con la galectina y la glutaredoxina-1 [Williamson et al. 2013]. Piruzian y colaboradores encontraron 10 proteínas con un aumento del doble o más en la expresión en la piel lesional en comparación con la piel no lesional, mediante la combinación de 2D-GE y MS. El aumento de estas proteínas (queratina 14, queratina 16, queratina 17, SCCA, SCCA-2, enolasa 1, superóxido dismutasa, galectina-7, S100A9 y S100A7) se asoció con una notable sobreexpresión de sus respectivos genes codificantes [Piruzian et al. 2010]. Schonthaler y colaboradores. realizaron análisis proteómicos imparciales de la epidermis psoriásica humana y también descubrieron que la S100A8- S100A9 (calprotectina) era la proteína más regulada [Schonthaler et al. 2013]. Del mismo modo, Lundberg y colaboradores, utilizaron un enfoque de detección proteómica imparcial para estudiar los cambios en la expresión de la proteína en el modelo de ratón de la psoriasis KC-Tie2. Además, validaron estos cambios en muestras de psoriasis humana. En total, 105 proteínas mostraron cambios, incluyendo</p>
--	--



	<p>la stefin A1, slc25a5, serpinb3b, y la peptidasa 6 relacionada con la calicreína (KLK6). De acuerdo con este estudio, se observó una mayor expresión genética de slc25a5, cistatina A, KLK6, y serpinB1 entre los controles sanos y las lesiones cutáneas psoriásicas implicadas y los queratinocitos primarios de la psoriasis [Lundberg et al. 2015]. Entre todos estos biomarcadores proteómicos, algunas proteínas como el S100A8, S100A9 o la proteína de unión de galectina 3 (G3BP) han sido validados mediante métodos ortogonales [Broome et al. 2003].</p>
--	---

*Tabla 2: Biomarcadores identificados en psoriasis.*

-----

*Mayo de 2020*